

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Genética**



**TESIS DOCTORAL**

**Dinámica de marcas epigenéticas, auxina endógena y pared celular en  
la embriogénesis de polen de plantas cultivadas forestales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Héctor Rodríguez Sanz**

Directoras

Pilar S. Testillano  
M.C. Risueño Almeida

**Madrid, 2015**



LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL POLEN  
DE PLANTAS CULTIVADAS

**CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**



**DINÁMICA DE MARCAS EPIGENÉTICAS,  
AUXINA ENDÓGENA Y PARED CELULAR EN LA  
EMBRIOGÉNESIS DE POLEN DE PLANTAS  
CULTIVADAS Y FORESTALES**

TESIS DOCTORAL

**Héctor Rodríguez Sanz**

Madrid, 2015



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**DINÁMICA DE MARCAS EPIGENÉTICAS,  
AUXINA ENDÓGENA Y PARED CELULAR EN LA  
EMBRIOGÉNESIS DE POLEN DE PLANTAS  
CULTIVADAS Y FORESTALES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR:**

**HÉCTOR RODRÍGUEZ SANZ**

**VºBº DIRECTORES DE TESIS**

Fdo. Dra. Pilar S. Testillano

Fdo. Dra. M.C. Risueño Almeida

Fdo. Héctor Rodríguez Sanz

**MADRID, 2015**

**LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL POLEN**

**DE PLANTAS CULTIVADAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**





**DÑA. PILAR SÁNCHEZ TESTILLANO Y DÑA. MARIA DEL CARMEN  
RISUEÑO ALMEIDA**, INVESTIGADORES DEL CONSEJO SUPERIOR DE  
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS EN EL CENTRO DE  
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DE MADRID

CERTIFICAN:

QUE LA TESIS DOCTORAL TITULADA:

**“DINAMICA DE MARCAS EPIGENETICAS, AUXINA ENDOGENA  
Y PARED CELULAR EN LA EMBRIOGENESIS DE POLEN DE  
PLANTAS CULTIVADAS Y FORESTALES”**, REALIZADA POR EL  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA **HÉCTOR RODRÍGUEZ SANZ**, EN EL  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CSIC) BAJO SU  
DIRECCIÓN REÚNE LAS CONDICIONES EXIGIDAS PARA OPTAR AL  
GRADO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

EN MADRID, 2015

FDO. DRA. PILAR SÁNCHEZ TESTILLANO

FDO. DRA. M. CARMEN RISUEÑO ALMEIDA



El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el grupo de investigación de BIOTECNOLOGÍA DEL POLEN DE PLANTAS CULTIVADAS del CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS de Madrid, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con ayuda de una beca del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2009-014245)

La investigación ha sido realizada en el marco de los siguientes proyectos:

-Proyectos del Plan Nacional:

BFU2008-00203

BFU2011-23752

-Proyecto de cooperación internacional:

Acción integrada Hispano-Portuguesa

PRI-AIBPT-2011-0763



En primer me gustaría agradecer a mis directoras de Tesis, las Dras. Pilar S. Testillano y M<sup>a</sup> Carmen Risueño, a Pilar por haberme acogido en su laboratorio, haberme enseñado y dirigido durante todos estos años con infinita paciencia, aconsejándome y haciéndome mejorar en aquellos aspectos en los que flaqueaba y haciéndome brillar en aquellos en los que destacaba. A M<sup>a</sup> Carmen por sus puntos de vista y sus diferentes opiniones que siempre me han obligado a pensar las cosas desde otro punto de vista y haciéndome mejorar.

Al Prof. Frantisek Baluska del Institute of Cellular and Molecular Botany, de la Universidad de Bonn, Alemania, por haberme acogido en su laboratorio donde inicié trabajos preliminares sobre la localización de auxina y polímeros de pared celular en raíces.

A la Prof. Claudia Köhler de la SLU, en Uppsala, Suecia, y a todo su grupo de investigación por haberme acogido dos veces en su laboratorio y por haberme enseñado diversas técnicas para el estudio de las modificaciones epigenéticas de histonas y haberme permitido realizar varios experimentos incluidos en esta tesis. Especialmente a Jordi Moreno Romero, que nunca se apartó de mi lado durante mi estancia en el laboratorio de la SLU, me ayudó en todo lo que pudo, siendo más que un compañero que me abrió las puertas de su casa y se ha convertido en un amigo fiel.

Al Prof. José Antonio Manzanera, de la Escuela Superior de Ingenieros de Montes de la Universidad Politécnica de Madrid, por sus enseñanzas sobre el cultivo *in vitro* del alcornoque, que me permitieron el establecimiento de los sistemas de embriogénesis de polen y de embriones cigóticos inmaduros en el laboratorio.

Al Prof. Aurelio Gómez Cadenas, del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, de la Universidad Jaume I, de Castellón, por su generosidad al permitirnos usar su equipo de cromatografía líquida para la puesta a punto de la cuantificación de fitohormonas en cultivos de microsporas y a la Dra. María López Climent por enseñarme la técnica y por su ayuda con estos ensayos.

A la Prof. Carmen Díaz Sala de la Universidad de Alcalá por sus sugerencias en la puesta a punto de los ensayos *in vitro* para la inhibición del transporte polar de auxina con NPA.

A la Dra. Dolores Rodríguez, de la Universidad de Salamanca, por haberme animado a seguir la carrera investigadora, y por haberme dado la oportunidad de entrar por primera vez en un laboratorio, te estaré siempre agradecido.

A la Dra. María Teresa Solís González, que ha sido mucho más que una profesora y compañera, siendo una amiga desde el primer día, que

nunca ha dejado de enseñarme cosas y con la que he pasado muchos momentos en los que hemos llorado y reído juntos, todo lo que te pueda decir aquí ya te lo habré dicho en persona muchas veces, gracias de corazón.

A los compañeros del laboratorio: a Vanesa porque siempre has conseguido arrancarme una sonrisa y me has ayudado en todo lo que has podido, a Ivett por sus detalladas explicaciones de los protocolos, a Ahmed por su atento cuidado de las plantas en mis viajes, y también a aquellos que ya han pasado por el laboratorio pero que no olvidaremos: a Deepack Prem, por haberme enseñado gran parte de lo que hoy en día se del cultivo *in vitro*, a María Rodríguez por enseñarme a ser más exigente, a Elen, que siempre estaba dispuesta a ayudar y con la que tanto nos hemos reído, a Faisal, Miren, María Bernal, Mohamed, Josefina, Rita y Sandra.

A Gosia, Livia, Virginia, Arancha y a tantos otros compañeros de plantas del CIB, que me habéis ayudado, con los que he debatido o charlado en los pasillos y en las comidas, a todos un abrazo y muchas gracias.

Y ahora me pongo con mis amigos, porque siempre donde hayamos estado nos hemos estado apoyando, nos hemos reído juntos, hemos pasado las penas juntos y que de una u otra manera me han ayudado a estar donde estoy hoy.

A Dra. Araceli Espí Plaza, la primera doctora del grupo, porque el destino ya sabía que íbamos a ser buenos amigos y nos juntó dos veces, y porque desde el primer día has estado a mi lado ayudándome, charlando, cenando o simplemente pasando el rato, porque ya sabes lo que es pasar por esto y que no es fácil poner en palabras los sentimientos, pero sabes cuánto te lo agradezco.

A Javi e Isma, porque siempre me han ayudado a pensar en otras cosas cuando la situación me sobrepasaba, por todas esas polémicas finales eurovisivas y porque son un ejemplo en más cosas de las que ellos se piensan.

A las chicas del MasterMix, a Azahara porque siempre descubres cosas nuevas, cotilleos, técnicas, trabajos, y porque siempre será mi bellotita somática, a Zaida porque me ha ayudado a ver las cosas de manera distinta y a quitarle hierro a las cosas, y a Clara, espero que estés bien y que nos volvamos a ver pronto.

A Miguel y a Alexis, porque pasaste de ser un colega de laboratorio a ser un amigo, una persona a la que siempre le puedo contar mis problemas, dudas y vivencias y porque siempre me has hecho reír, y Alexis porque has sabido escucharme, comprenderme y siempre he escuchado tus consejos.

A Patricia porque tú sabes lo que has sido para mí muchos años, porque siempre que nos ponemos a hablar por teléfono se nos va de las

manos y por todos esos maravillosos años en Salamanca, y porque en mi opinión de experto...obi

A Vero porque desde que te conocí siempre me has echado una mano, porque siempre has tenido un rato para escucharme y porque llevas siendo una amiga fiel desde el inicio de los tiempos.

A Kike, Sergio, Santi y Fran porque me han acogido como un cachorro más, haciéndome sentir parte de la manada.

A todos aquellos amigos, conocidos y personas que me han ayudado pero que me he olvidado de mencionar también quiero darles las gracias porque hayáis hecho lo que hayáis hecho habéis contribuido de una u otra forma a que haya llegado a esta meta

Y sí, ahora te toca a ti, Víctor, por todo, porque no creo que todavía sepas lo importante que estas siendo en mi vida, por todos esos buenos momentos, por ayudarme en todo lo que has podido, y en lo más importante en cuidarme y en preocuparte por mí, y por todo lo que nos queda.

Y como no, he dejado lo mejor para el final, quiero dar las gracias a mis padres y a mi hermana, porque sin vosotros no habría llegado hasta aquí, porque me habéis enseñado todo lo que hoy sé, porque siempre habéis sido mi ejemplo a seguir, porque me habéis apoyado en todo momento, porque habéis sido mis consejeros, confidentes y terapeutas, por todo vuestro cariño, ayuda, comprensión y por todo lo que soy como persona os lo debo a vosotros.





## INDICE

RESUMEN/ABSTRACT.....	7
RESUMEN GENERAL .....	9
INTRODUCCIÓN.....	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
CONCLUSIONES .....	12
ABSTRACT .....	15
INTRODUCTION.....	15
RESULTS AND DISCUSSION .....	15
CONCLUSIONS .....	18
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	19
1. EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS .....	21
1. a. Embriogénesis cigótica .....	21
1. b. Embriogénesis del polen .....	22
1. c. Embriogénesis somática.....	27
1. d. Aplicabilidad de la embriogénesis. ....	29
2. SISTEMAS DE ESTUDIO.....	30
2.a. <i>Brassica napus</i> L.....	30
2.b. <i>Quercus suber</i> L.....	31
3. MARCAS EPIGENÉTICAS .....	33
3.a. Metilación del DNA.....	34
3.b. Modificaciones de Histonas .....	36
4. AUXINAS .....	40
5. PARED CELULAR Y PECTINAS .....	44
OBJETIVOS/OBJECTIVES.....	47
OBJETIVOS .....	49
OBJECTIVES.....	51
MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	55

1.a. Yemas florales de <i>Brassica napus</i> L. ....	55
1.b. Anteras y embriones cigóticos inmaduros de <i>Quercus suber</i> L. ....	55
2. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE MICROSPORAS, ANTERAS Y EMBRIONES INMADUROS PARA INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS. ....	56
2.a. Cultivo <i>in vitro</i> de microsporas de <i>Brassica napus</i> L. ....	56
2.b. Cultivo <i>in vitro</i> de anteras y embriones cigóticos inmaduros de <i>Quercus suber</i> L. ....	62
3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ....	69
3.a. Fijación ....	69
3.b. Inclusión en resina Technovit 8100 y obtención de cortes semifinos. ....	70
3.c. Recubrimiento de portaobjetos con APTES ....	71
3.d. Obtención de cortes en criostato. ....	72
3.e. Obtención de cortes en vibratomo ....	74
3.f. Tinciones y citoquímicas. ....	75
4. INMUNOFLUORESCENCIA. ....	76
4.a. Inmunofluorescencia sobre cortes de Technovit 8100 ....	79
4.b. Inmunofluorescencia sobre cortes de vibratomo y criostato ....	80
5. TÉCNICAS DE “INMUNO-BLOT” ....	81
5.a. Preparación de muestras para la extracción. ....	81
5.b. Extracción de proteínas ....	81
5.c. Determinación de la concentración de proteínas ....	82
5.d. Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) ....	83
5.e. “Western-Blot” de geles SDS-PAGE ....	83
5.f. Técnicas de “Inmuno Dot-Blot” ....	85
6. CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE METILACIÓN GLOBAL DEL DNA GENÓMICO ....	85
6.a. Preparación del material vegetal. ....	85
6.b. Extracción del DNA genómico ....	86
6.c. Evaluación del DNA genómico. ....	86
6.d. Cuantificación del porcentaje de DNA genómico metilado. ....	86
7. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FITOHORMONAS. ....	87

7.a. Preparación de las muestras .....	87
7.b. Extracción de fitohormonas .....	87
7.c. Cuantificación de fitohormonas mediante LC/ESI-MSMS.....	88
8. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-qPCR .....	89
8. a. Preparación del material vegetal.....	89
8.b. Extracción de RNA y síntesis de cDNA .....	89
8.c. Selección de oligonucleótidos.....	89
8.d. Condiciones para la qPCR.....	90
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	90
RESULTS.....	91
PUBLICACIÓN I:.....	93
Resumen de la PUBLICACIÓN I: .....	95
Los cambios en la metilación y acetilación de histonas durante la reprogramación a embriogenesis de la microspora ocurren paralelamente con cambios en la expresión de BnHKMT y BnHAT y están asociados con la totipotencia celular, la proliferación y la diferenciación en <i>Brassica napus</i> . .....	95
ABSTRACT.....	97
INTRODUCTION.....	98
MATERIAL AND METHODS.....	99
RESULTS.....	102
DISCUSSION.....	109
ACKNOWLEDGEMENTS .....	112
PUBLICACIÓN II:.....	113
Resumen de la PUBLICACIÓN II: .....	115
La biosíntesis, acción y transporte de auxina están implicados en el inicio y progresión de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés en <i>Brassica napus</i> L. ....	115
ABSTRACT.....	117
INTRODUCTION.....	117
MATERIAL AND METHODS.....	120
RESULTS.....	124
DISCUSSION.....	137

CONCLUSIONS .....	142
ACKNOWLEDGEMENTS .....	142
PUBLICACIÓN III: .....	143
Resumen de la PUBLICACIÓN III: .....	145
Marcadores tempranos presentes en dos rutas embriogénicas, de microsporas y de embriones cigóticos inmaduros en alcornoque <i>Quercus suber</i> L. ....	145
ABSTRACT .....	147
BACKGROUND .....	148
MATERIAL AND METHODS.....	151
RESULTS .....	156
DISCUSSION .....	168
CONCLUSIONS .....	173
ACKNOWLEDGEMENTS .....	174
DISCUSIÓN .....	175
DISCUSIÓN GENERAL .....	177
1. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS DE HISTONAS Y SU PAPEL EN LA EMBRIOGÉNESIS DEL POLEN DE <i>Brassica napus</i> . ....	180
1a. Correlación entre los cambios de H3K9me2 y la expresión de BnHKMT durante la embriogénesis de polen y su asociación con la diferenciación del embrión. ....	180
1b. Correlación de cambios en acetilación de histonas y expresión de BnHAT durante la embriogénesis del polen y su asociación con la totipotencia celular y proliferación. ....	181
2. PAPEL DE LA AUXINA ENDÓGENA EN EL INICIO Y PROGRESIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS DE POLEN INDUCIDA POR ESTRÉS EN <i>Brassica napus</i> .....	183
2a. La reprogramación de la microspora e inicio de embriogénesis está asociada al aumento de auxina endógena y de expresión de BnNIT2. ....	184
2b. La progresión de la embriogénesis del polen es bloqueada por la inhibición de la acción de la auxina con PCIB. ....	186
2c. El bloqueo del transporte polar de auxinas por NPA cambia la distribución intracelular de auxina en el embrión y disminuye la eficiencia embriogénica. ....	186

3. FACTORES COMUNES A LAS RUTAS DE EMBRIOGÉNESIS, DE MICROSPORAS Y EMBRIONES CIGÓTICOS, COMO MARCADORES TEMPRANOS DE CÉLULAS EMBRIOGÉNICAS. ....	188
3a. Al inicio de la embriogénesis la metilación global de DNA disminuye y el patrón de heterocromatina nuclear cambia a masas de pequeño tamaño.....	189
3b. La pared celular aumenta la proporción de pectinas esterificadas en los embriones multicelulares tempranos. ....	190
3c. El progreso de embriones multicelulares tempranos requiere el incremento y acumulacion diferencial de auxina intracelular.....	191
3d. Las dos rutas embriogénicas, de microsporas y de embrión cigótico inmaduro, muestran los mismos marcadores tempranos: hipometilación del DNA, alta esterificación de pectinas y altos niveles de auxina. ....	192
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	195
CONCLUSIONES.....	197
CONCLUSSIONS .....	199
BIBLIOGRAFIA.....	201
ANEXOS.....	225



## **RESUMEN/ABSTRACT**





## RESUMEN GENERAL

### DINÁMICA DE MARCAS EPIGENÉTICAS, AUXINA ENDÓGENA Y PARED CELULAR EN LA EMBRIOGÉNESIS DE POLEN DE PLANTAS CULTIVADAS Y FORESTALES

#### INTRODUCCIÓN

La embriogénesis del polen es el proceso en el cual una célula en proceso de diferenciación, la microspora, abandona su programa de desarrollo gametofítico mediante la aplicación de un estrés, generalmente por temperatura, para dar lugar a un embrión completo capaz de germinar y regenerar una planta adulta.

La embriogénesis del polen es una potente herramienta biotecnológica en mejora vegetal como método para la producción rápida de líneas isogénicas y generación de nueva variabilidad genética, así como de propagación de semillas mediante la obtención de doble-haploides. Estas plantas doble-haploides son la vía mejor y más rápida de conseguir homocigosis completa, a través de la cual se eliminan genes deletéreos y de fijar genotipos de interés en una sola generación, reduciendo los costes y tiempo de obtención de cultivares; además de su utilidad en estudios genéticos o de mutagénesis y en proyectos de secuenciación masiva de grandes genomas donde el uso de material haploide resulta de gran ayuda, como en el caso de los árboles.

En esta tesis doctoral se aportan datos sobre varios factores y procesos celulares con un papel clave en la embriogénesis de microsporas, en dos especies distintas, una herbácea modelo, la colza (*Brassica napus*), y una leñosa recalcitrante, el alcornoque (*Quercus suber*), mediante diversos abordajes. Los resultados obtenidos identificando factores en común entre dos rutas embriogénicas distintas, la embriogénesis del polen y la embriogénesis somática de embriones cigóticos, presentan nuevos datos de los mecanismos reguladores del proceso de embriogénesis *in vitro*.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han analizado tres factores fundamentales: cambios en marcas epigenéticas, dinámica de auxina endógena y modificaciones de la pared celular. El análisis comparativo en dos especies y dos rutas embriogénicas de la dinámica de estos factores han permitido presentar nuevos datos de los

mecanismos reguladores del proceso de embriogénesis *in vitro* y además caracterizar marcadores tempranos del proceso.

**-Modificaciones epigenéticas:** Numerosos procesos de crecimiento y desarrollo vegetal están regulados en mayor o menor medida por modificaciones epigenéticas, en la propia hebra del DNA (metilación del DNA) o en las histonas (metilación y acetilación de histonas). Hemos estudiado:

a/ *Modificaciones en el patrón de la histona dimetilada H3, (H3K9me2, marca epigenética represora de actividad génica), y de las histonas acetiladas H3 y H4 (H3Ac y H4Ac, marcas epigenéticas activadoras de expresión génica) durante la embriogénesis de polen en Brassica napus.* Se han realizado ensayos de inmunolocalización con anticuerpos contra H3K9me2, H3Ac y H4Ac, “Western-Blot” y análisis de expresión mediante qPCR de dos genes implicados en estas modificaciones, BnHKMT, gen que codifica una enzima metiltransferasa responsable de la metilación de H3K9, y el gen BnHAT, que codifica una enzima que añade grupos acetilo a las histonas, H3 y H4. Los resultados muestran que el patrón de la marca H3K9me2 y de expresión del gen BnHKMT, aumenta progresivamente con el desarrollo embriogénico, siendo H3K9me2 más abundante en núcleos de células diferenciadas en embriones avanzados. Los perfiles de distribución de H3Ac y H4Ac son similares entre ellos, siendo la acetilación más alta en las células proliferantes del embrión. El patrón de expresión de BnHAT, es análogo al perfil de H3Ac y H4Ac, los cuales están asociados a la microspora vacuolada y su estado totipotente y a células en proliferación en etapas posteriores de la embriogénesis de polen.

b/ *Modificaciones en el nivel y el patrón de metilación del DNA durante la embriogénesis de polen y somática de embriones cigóticos en Quercus suber.* El estudio realizado mediante inmunofluorescencia y análisis confocal con anticuerpos anti-5mdC y cuantificación de la metilación del DNA por ensayos tipo ELISA, ha revelado un patrón de metilación similar en ambas rutas embriogénicas, en el que se produce hipometilación al inicio de la embriogénesis, asociada a la activación génica del nuevo programa de desarrollo, y posteriormente un aumento gradual de metilación del DNA con la diferenciación del embrión.

Estos resultados indican la existencia de una reprogramación epigenética durante la inducción de embriogénesis *in vitro*, en la que intervienen las modificaciones de histonas represoras y activadoras y la metilación del DNA.

**-Dinámica de la auxina endógena:** La fitohormona auxina tiene una función esencial en el desarrollo del embrión cigótico, sin embargo no se conoce su dinámica y posible papel durante la embriogénesis del polen.

Se han cuantificado los niveles de ácido indol-acético, (IAA), auxina endógena mayoritaria, utilizando la cromatografía líquida unida a un espectrómetro de masas a través de una interfase de electrospray (LC/ES-MSMS). La localización del IAA endógeno se ha analizado mediante inmunolocalización con anticuerpos específicos y análisis en microscopía laser confocal. Así mismo, el perfil de expresión del gen que codifica una enzima implicada en la ruta de biosíntesis de IAA, *BnNIT2*, ha sido estudiado mediante qPCR. También se han estudiado los efectos del tratamiento con una droga que bloquea la acción del IAA, el PCIB, sobre la eficiencia de la embriogénesis. Y los efectos de los tratamientos, con una droga que inhibe el transporte polar de auxinas, el NPA, sobre la distribución del IAA endógeno y sobre la eficiencia de la embriogénesis de polen de *Brassica napus*.

Los resultados obtenidos revelaron que se produce un aumento de la concentración de IAA endógeno al inicio de la embriogénesis, con las primeras divisiones y gradualmente en las etapas más avanzadas. La señal de inmunofluorescencia aumentó inmediatamente después de la inducción a embriogénesis, en ambas especies de estudio, la colza y el alcornoque y en las dos rutas embriogénicas, la embriogénesis del polen y la embriogénesis somática de embrión cigótico. Esta señal coincide con el perfil de expresión del gen de la enzima nitrilasa, *BnNIT2*, implicada en la ruta de biosíntesis del IAA, produciéndose un incremento rápido de la expresión de este gen desde las primeras etapas de la embriogénesis y unos niveles de expresión muy altos en el embrión multicelular temprano.

El análisis de los tratamientos con el PCIB, reveló que esta droga afecta a la embriogénesis provocando una disminución en el número de embriones y una mayor proporción de embriones con defectos/aberrantes. Con la aplicación del NPA el proceso de embriogénesis sufre un retraso y una disminución en la eficiencia de embriogénesis obteniéndose menos embriones que en los cultivos normales. El NPA además produce la alteración del patrón y normal distribución de IAA en estos embriones perdiendo su distribución polar en los embriones torpedo, última etapa que es capaz de desarrollarse incluso a bajas concentraciones de NPA.

Estos resultados nos indican que la biosíntesis de auxina, su acción y transporte polar están implicadas en el inicio y progresión de la embriogénesis de polen.

**-Modificaciones de la arquitectura de la pared celular:** Cambios en la arquitectura de la pared celular ocurren durante diversos procesos de desarrollo, pero son muy pocos los datos disponibles de estos cambios en el proceso de embriogénesis en especies leñosas.

Se realizaron inmunolocalizaciones con anticuerpos específicos que reconocen pectinas no esterificadas, JIM5, y esterificadas, JIM7, y cuantificaciones de ensayos de “Dot-Blot” en embriones derivados de polen y de embrión cigótico del alcornoque. Los resultados con JIM5 mostraron un perfil de pectinas no esterificadas que va decreciendo con la progresión de la embriogénesis, mientras que el perfil de las pectinas esterificadas (marcadas con JIM7) presenta un máximo al inicio de la embriogénesis, en el embrión multicelular mientras que en etapas posteriores desciende.

Estos datos indican que la reprogramación del polen e inicio de la embriogénesis va acompañada de una remodelación de la arquitectura de la pared celular con un aumento en la proporción de pectinas esterificadas, las cuales aportan a la pared las propiedades mecánicas requeridas para el inicio del nuevo programa de desarrollo.

**-Marcadores tempranos de embriogénesis:** Los resultados obtenidos en los análisis de las modificaciones epigenéticas, la dinámica de auxina y la remodelación de la pared celular en dos especies y dos rutas embriogénicas distintas, han permitido identificar marcadores tempranos presentes diferencialmente en las células embriogénicas desde etapas iniciales del proceso. Las células embriogénicas, desde las primeras etapas, se caracterizan por: hipometilación del DNA, histonas acetiladas, altos niveles de auxina endógena y paredes celulares ricas en pectinas esterificadas. Estos factores constituyen marcadores comunes e informan sobre los mecanismos reguladores que subyacen al proceso de embriogénesis *in vitro* y que sirven para la detección temprana de células embriogénicas diferenciándolas de las que no responden tanto en cultivos líquidos de colza, como en cultivos en medio sólido de alcornoque en procesos de embriogénesis directa o indirecta, en los que se forman masas embriogénicas, tanto en la embriogénesis de polen como en somática a partir de embriones cigóticos.

## CONCLUSIONES

Los resultados del análisis de la inducción de embriogénesis de microsporas realizado en esta tesis han revelado el papel clave que juegan en el proceso: las modificaciones epigenéticas, asociadas a cambios globales en la estructura dinámica de la cromatina con implicaciones sobre la expresión génica, el control hormonal, particularmente de las auxinas endógenas y la remodelación de la arquitectura de la pared celular debida a cambios en el estado de esterificación de las pectinas. Todos estos factores que se desencadenan con el cambio de programa a la ruta embriogénica están modulando los mecanismos reguladores del proceso, los cuales están conservados en dos rutas

embriogénicas en dos especies muy distintas, una herbácea (colza) y una leñosa (alcornoque), habiéndose identificado marcadores tempranos comunes a ellas. Estos hallazgos se podrían extender con fines aplicados para manipular la eficiencia de embriogénesis *in vitro* y mejorar otros sistemas de especies recalcitrantes de interés agroalimentario, medioambiental y forestal.



## **ABSTRACT**

### **DYNAMICS OF EPIGENETICS MARKS, ENDOGENOUS AUXIN AND CELL WALL DURING POLLEN EMBRYOGENESIS IN CROP AND FORESTRY PLANTS**

## **INTRODUCTION**

Pollen embryogenesis is the process in which a cell in differentiation process, the microspore, abandons the gametophytic developing program by the application of a stress treatment, usually by temperature, to originate a complete embryo which is able to germinate and regenerate an adult plant.

Pollen embryogenesis is a powerful biotechnological tool in plant breeding as a system for the rapid production of isogenic lines and the generation of new genetic variability, as well as for seed propagation by obtaining doubled haploids. These doubled haploid plants are the best and faster way to obtain complete homozygosity, condition in which deleterious genes are deleted and interesting genotypes are fixed in one generation, reducing the cost and time of obtaining cultivars; also it is very useful in genetic or mutagenesis studies and in massive sequencing projects of extremely large genomes where the use of haploid material is very helpful, like in trees.

In this PhD thesis, data are provided about several factors and cellular processes with a key role in microspore embryogenesis, in two different species, a model herbaceous plant, rapeseed (*Brassica napus*), and a recalcitrant woody species, cork oak (*Quercus suber*), by different approaches. The results have revealed common factors between two different embryogenic pathways, pollen embryogenesis and somatic embryogenesis from zygotic embryos, and show new data on the regulatory mechanisms of the *in vitro* embryogenic process.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Three fundamental factors were analysed: changes in epigenetic marks, dynamics of endogenous auxin and modifications in the cell wall. The comparative analysis in two species and two embryogenic pathways of the dynamics of these factors have allowed to present new data on the regulatory mechanisms of the *in vitro* embryogenesis and also to characterize early markers of the process.



**-Epigenetic modifications:** Many processes of plant growth and development are regulated in different degrees by epigenetic modifications, in the DNA strand itself (DNA methylation) or in the histones (histone methylation and acetylation). We have studied:

a/ *Modifications in the pattern of the dimethylated histone H3, (H3K9me2, repressing epigenetic mark of gene activity), and the acetylated histones H3 and H4 (H3Ac and H4Ac, activating epigenetic marks of gene activity), during pollen embryogenesis in Brassica napus.* Immunolocalization and “Western-Blot” assays were made with antibodies against H3K9me2, H3Ac and H4Ac, and expression analysis was performed by qPCR of two genes implicated in these modifications: BnHKMT, gene that encodes a methyltransferase enzyme responsible for the methylation H3K9, and BnHAT, gene that encodes an enzyme that adds acetyl groups to the H3 and H4 histones. The results show that the pattern of the H3K9me2 mark and the expression of the gene BnHKMT progressive increase with embryogenic development, being H3K9me2 more abundant in differentiated cell nuclei in advanced embryos. H3Ac and H4Ac distribution patterns are similar, the acetylation is higher in embryo proliferating cells. The BnHAT expression pattern is analogous to the pattern of H3Ac and H4Ac, that are associated to vacuolated microspores, and to cells in proliferation at later stages of the pollen embryogenesis.

b/ *Modifications in the level and pattern of DNA methylation during pollen and somatic embryogenesis from zygotic embryos in Quercus suber.* The study, performed by immunofluorescence and confocal analysis with anti-5mdC antibodies and DNA methylation quantification by ELISA-like assays, has revealed a similar methylation pattern in both embryogenic pathways, in which hypomethylation happens at the initiation of embryo formation, associated with the gene activation of the new developmental program; later, the DNA methylation gradually increases with the differentiation of the embryo.

These results suggest the existence of an epigenetic reprogramming during the *in vitro* embryogenesis induction, in which repressing and activating histone modifications and DNA methylation are involved.

**-Dynamics of the endogenous auxin:** The plant hormone auxin has an essential function in the development of the zygotic embryo, however the dynamics and possible role of this phytohormone during pollen embryogenesis is still unknown.

The levels of indol-acetic acid (IAA), the main endogenous auxin, were quantified using liquid chromatography linked to mass spectrometer through an electrospray interphase (LC/ES-MSMS). The localization of the endogenous auxin was analysed by immunolocalization with specific

antibodies and confocal laser microscopy. Also, the expression pattern of the gene that encodes an enzyme involved in the IAA biosynthesis pathway, *BnNIT2*, has been studied by qPCR. Additionally, the effects of the treatments with a drug that blocks the IAA action, the PCIB, and a drug that inhibits the auxin polar transport, the NPA over the pollen embryogenesis efficiency and the IAA endogenous distribution, were studied.

The results obtained revealed that an increase in the endogenous IAA concentration occurs at the beginning of the embryogenesis, at the first divisions, and a gradual increase at later stages. The immunofluorescence signal increases just after the embryogenesis induction in both studied species, rapeseed and cork oak, and in the two embryogenic pathways, pollen embryogenesis and somatic embryogenesis from zygotic embryo. This signal correlates with the *BnNIT2* expression pattern, gene of a nitrilase enzyme involved in the IAA biosynthetic pathway, where a fast increase of the gene expression was observed at the first embryogenesis stages and early multicellular embryo.

The analysis of the PCIB treatments revealed that this drug affects the embryogenesis, obtaining less number of embryos and a higher proportion of abnormal embryos. The application of NPA treatments produced a delay and a reduction of embryogenesis efficiency, obtaining less embryos than in normal cultures. Also, the NPA treatments produced a change in the pattern of IAA distribution in the embryos; auxin did not show its normal polar distribution in torpedo embryos, last stage of development reached in NPA-treated cultures, even at low NPA concentrations.

These results show that the auxin biosynthesis, its action and polar transport are involved in the initiation and progression of pollen embryogenesis.

**-Modifications of the cell wall architecture:** Changes in the architecture of the cell wall occurs during diverse processes of development, but there is very few data available of these changes in embryogenesis processes of woody species.

The immunolocalization was performed with specific antibodies that recognise non-esterified pectins, JIM5, and esterified pectins, JIM7, and also by quantifications of “Dot-Blot” assays in cork oak embryogenesis from pollen and zygotic embryos. The results with JIM5 antibody show a pattern of non-esterified pectins that decreased with the embryogenesis progression, while the pattern of esterified pectins (labelled with JIM7 antibody) showed a maximum at the embryogenesis initiation, in early multicellular embryos, and at later stages it decreased.

These data suggest that pollen reprogramming and embryogenesis initiation are accompanied by a remodelling of the cell wall architecture with an increase in the proportion of esterified pectins,

which gives to the cell wall the mechanics properties required for starting the new developmental program.

**-Early markers of embryogenesis:** The results obtained in the analysis of epigenetic modifications, dynamics of the auxin and the cell wall remodelling in two species and in two different embryogenic pathways, allow us to identify early markers present in the embryogenic cells at early stages of the process. The embryogenic cells, from early stages, are characterized by: DNA hypomethylation, acetylated histones, high levels of endogenous auxin and cell walls rich in esterified pectins. These factors are common marks for both pathways and inform about the regulatory mechanisms that underlay *in vitro* embryogenesis processes. Also, these factors are useful for the early detection of embryogenic cells, differentiating them from cells that are not reprogrammed in different systems like liquid cultures of rapeseed or solid cultures of cork oak, as well as in direct or indirect embryogenic processes, in which embryogenic masses are formed, and in pollen embryogenesis and somatic embryogenesis from zygotic embryos as well.

## CONCLUSIONS

The results of the microspore embryogenesis induction analysis performed in this thesis have revealed the key role played by: the epigenetic modifications, associated with global changes in the dynamic structure of the chromatin and related to the gene expression, the hormonal control, specially the endogenous auxin, and the remodelling of the architecture of the cell wall produced by changes in the degree of pectin esterification. All these factors that are triggered by the change of program towards embryogenesis are modulating the regulatory mechanisms of the process, which are conserved in two embryogenic pathways, and two different species, an herbaceous plant (rapeseed) and a woody species (cork oak), identifying early markers common to both of them. These findings can be used in applications for manipulating *in vitro* embryogenesis efficiency and to improve other systems of recalcitrant species with agricultural, environment and forestry interest.

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**



## **1. EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS**

### **1. a. Embriogénesis cigótica**

La embriogénesis es el proceso biológico por el que el cigoto, célula que se forma tras la fusión de los gametos, se desarrolla para producir un embrión completo capaz de desarrollar hojas, tallo y raíz. El proceso de embriogénesis es complejo y deben establecerse los meristemos, tanto el meristemo apical del tallo, como el meristemo apical de la raíz. También debe establecerse el patrón morfológico, diferenciarse los distintos tipos de tejidos, generarse los cotiledones, órganos especializados en el almacenamiento de sustancias de reserva, que posteriormente serán fundamentales durante la germinación de la semilla, y también debe posibilitarse la latencia de la nueva planta hasta que las condiciones sean favorables para la germinación (Goldberg et al. 1994).

En las especies dicotiledóneas la embriogénesis se inicia cuando el cigoto se divide de manera asimétrica, dando lugar a una gran célula basal y una célula apical de menor tamaño. Esta división marcará el futuro eje apical-basal del embrión y de la planta (Pritchard et al. 1964; Schulz y Jensen 1968; Jurgens 1995). La célula basal es la que tras sucesivas divisiones formará el suspensor, órgano que proporciona el anclaje, posición y aporte de nutrientes necesarios para el correcto desarrollo del embrión (Goldberg et al. 1994). Por el contrario, la célula apical dará lugar, tras un número definido de divisiones, al embrión propiamente dicho, en el que se observa la primera diferenciación celular en el embrión globular, formándose la protodermis (West y Harada 1993). Después, el embrión crece y cambia de morfología, pasando por una serie de fases denominadas, corazón, torpedo y embrión cotiledonar (Gray et al. 1991). Es durante estas fases cuando el embrión sufre una serie de procesos de diferenciación, se produce la aparición de los cotiledones a partir de dos dominios en el extremo apical, un proceso que resulta drástico en la formación del embrión, al mismo tiempo comienza la elongación del hipocotilo del eje embrionario y el meristemo radicular comienza su diferenciación. El embrión tiene ahora una simetría bilateral y forma de corazón. Posteriormente se produce mediante divisiones celulares un aumento de tamaño de los cotiledones y del eje, a esta etapa se le denomina embrión torpedo. La embriogénesis continua a través de un aumento de tamaño formándose así, el embrión cotiledonar y posteriormente el embrión maduro. Durante la maduración del embrión, las células internas comienzan a especializarse en la acumulación de proteínas, reservas lipídicas y carbohidratos que durante el proceso de germinación el embrión utilizará como fuente de nutrientes (Mansfield et al. 1991). En la última etapa del proceso de maduración del embrión, éste alcanza su máximo tamaño, se produce una deshidratación de las capas celulares que lo rodean y se ralentizan las actividades metabólicas hasta casi detenerse, es decir el embrión entra en el periodo de latencia (Goldberg et al. 1989; Mansfield et al. 1991; West y Harada 1993).

## 1. b. Embriogénesis del polen

La formación de embriones a partir del polen fue descubierta por Guha y Maheshwari en 1964 (Guha y Maheshwari 1964) en cultivos de anteras de *Datura innoxia*. Cuando cultivaban anteras en un medio con sales minerales, hidrolizado de caseína, ácido indol-acético y kinetina, observaron que muchas de las granos de polen presentes en las anteras formaban embriones.

El proceso de embriogénesis del polen se basa en la desviación de la microspora de su ruta normal de desarrollo gametofítico, que daría lugar al grano de polen, a la ruta embriogénica, que dará lugar a embriones haploides y plantas haploides, que pueden diploidizar de manera espontánea o inducida.

Las plantas haploides, que mediante la duplicación del genoma se transforman en doble-haploides, son una potente herramienta biotecnológica en mejora vegetal como método para la producción rápida de líneas isogénicas y generación de nueva variabilidad genética, así como en propagación de genotipos seleccionados en especies con largos ciclos reproductivos o baja producción de semillas, además tienen gran importancia debido a la utilidad que se puede dar a estas plantas para estudios biotecnológicos y de investigación básica; en este campo, la producción de doble-haploides de colza, tabaco y cebada, especies modelo para el proceso, se han convertido en una herramienta básica (Germanà 2011a). De hecho, la producción de haploides mediante este sistema ha sido de gran interés para estudios de mejora vegetal en numerosos grupos de investigación (Magoon y Khanna 1963; Kasha 1974; Zhang et al. 1990; Jain et al. 1996; Smýkal 2000; Maluszynski et al. 2003; Andersen 2005; Palmer et al. 2005; Germanà et al. 2006; Forster et al. 2007; Xu et al. 2007; Touraev et al. 2009; Seguí-Simarro et al. 2011; Dunwell 2010; Germanà 2011a). Las plantas doble-haploides son la vía mejor y más rápida de conseguir homocigosis completa, fijándose genotipos de interés en una sola generación (Forster et al. 2007) reduciendo el tiempo y costes de obtención de cultivares, siendo la vía más eficaz de propagación de plantas mejoradas, además de su utilidad en estudios genéticos o de mutagénesis y en proyectos de secuenciación masiva de grandes genomas donde el uso de material haploide resulta de gran ayuda, como en el caso de los árboles. No obstante, hay otras especies de interés científico y económico como *Arabidopsis* o tomate muy recalcitrantes a la inducción de embriogénesis de polen todavía no ha sido posible generar embriones ni plantas haploides o doble-haploides.

La microspora se forma después de la meiosis y sufre una larga interfase que termina con un proceso de vacuolización formándose una gran vacuola central y el núcleo se encuentra desplazado en una posición periférica provocando una reorganización del citoplasma (Shivanna y Johri 1985). El núcleo adquiere una organización estructural de abundante cromatina descondensada con

pequeñas masas de cromatina condensada y un nucléolo muy activo de gran tamaño con abundante componente granular, organización típica de células activas en transcripción (González-Melendi et al. 1995). Esta fase de microspora vacuolada previa a la mitosis es la etapa de desarrollo adecuada y de mayor respuesta para la aplicación del estrés para inducir el cambio de programa de esta célula en distintas especies herbáceas y leñosas como se muestra en la Figura 1 (Bárány et al. 2005; Germanà et al. 2011a; Ramírez et al. 2003; Bueno et al. 2005; Solís et al. 2008).

Los cambios en la expresión génica que se producen en la célula reprogramada tras el estrés inductor suponen una reorganización celular que afecta a núcleo y citoplasma en respuesta al estrés, desviación del programa de desarrollo gametofítico y expresión del programa de embriogénesis (Pauls et al. 2006). Se han descrito diferentes genes, proteínas y compuestos metabólicos con expresión diferencial en varias de esas etapas (Ramírez et al. 2004; Seguí-Simarro et al. 2005; Bárány et al. 2005; Massonneau et al. 2005; Satpute et al. 2005; Seguí-Simarro 2006; Solís et al. 2006; Solís et al. 2008; Testillano y Risueño 2008; Bárány et al. 2010a; Bárány et al. 2010b; Rodríguez-Serrano et al. 2012; Solís et al. 2012; El-Tantawy et al. 2013; Rodríguez-Sanz et al. 2014; El-Tantawy et al. 2014). Aunque todavía son muchas las incógnitas sobre los mecanismos reguladores del proceso. Hay otras células que a pesar de ser sometidas al estrés inductor siguen el desarrollo gametofítico hasta polen maduro (Hosp et al. 2007; Satpute et al. 2005), mientras que otras inician un programa de muerte celular programada (Rodríguez-Serrano et al. 2012; Solís 2012).

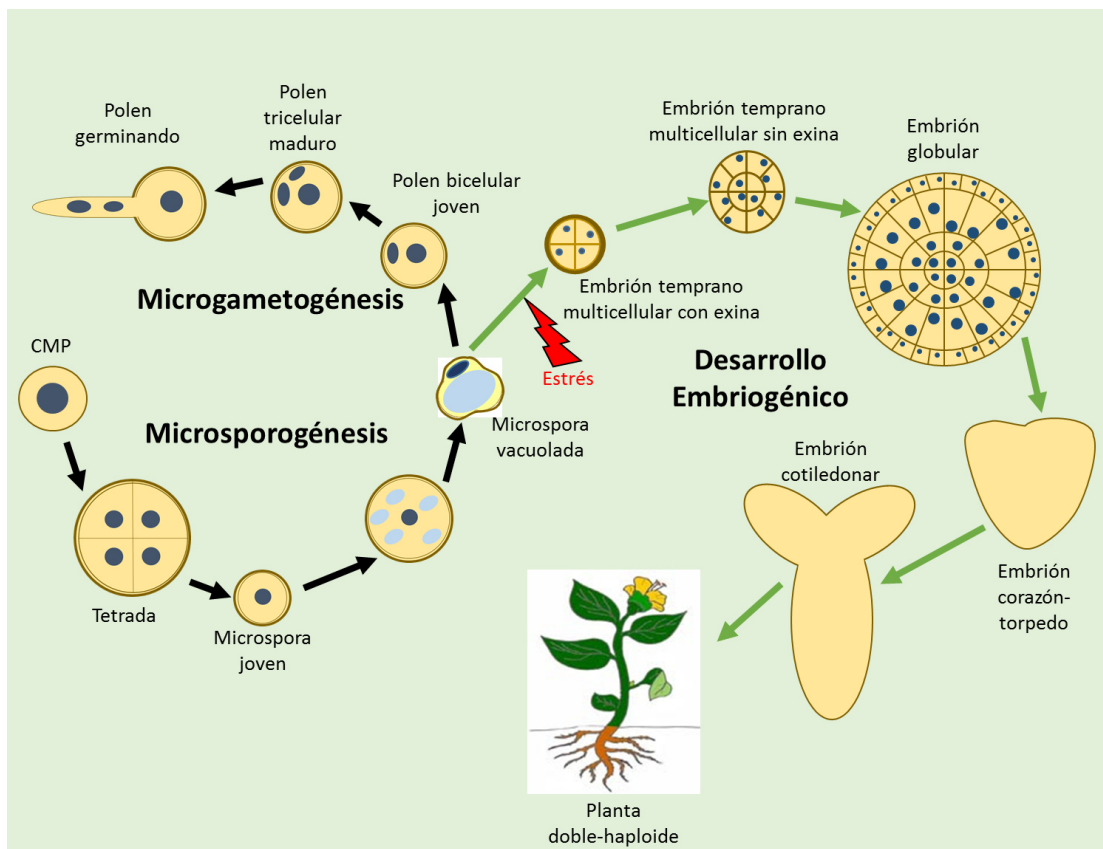
La inducción de embriogénesis del polen en el cultivo *in vitro* de anteras o de microsporas aisladas, se ha descrito ya en más de 250 especies vegetales, entre las que se incluyen especies herbáceas cultivadas de interés agronómico, como maíz, cebada, arroz, tabaco, trigo y colza (Maluszynski et al. 2003). Posteriormente también fue descrita en otras especies leñosas de interés agronómico y forestal, como el mandarino, naranjo amargo o alcornoque (Srivastava y Chaturvedi 2008; Bueno et al. 1997, 2005; Germanà et al. 2006, 2009).

Las especies leñosas son plantas de crecimiento lento y en las que la propagación vegetativa convencional es muy poco efectiva (Bueno et al. 1997; McCown 2000; Bueno et al. 2003). Debido a esta causa la puesta a punto de la embriogénesis de polen resulta de gran interés, ya que las plantas haploides y doble-haploides regeneradas tienen un gran potencial de uso en programas de mejora vegetal, en investigación de mutaciones, selección de cultivares, transformación genética y además, en la producción de homocigotos que son necesarios para su uso como líneas parentales de F1 (Germanà 2011b).

En las especies estudiadas en esta tesis, las microsporas aisladas de *Brassica napus* y de *Quercus suber* pueden ser reprogramadas a embriogénesis *in vitro* mediante un tratamiento de estrés por



temperatura, en medios de cultivo libres de reguladores de crecimiento, produciendo embriones de los que se pueden regenerar plantas haploides y doble-haploides que tienen una gran utilidad en biotecnología como se verá más adelante.



**Figura 1:** Esquema de la reprogramación del polen a embriogénesis.

Además la embriogénesis del polen es de gran interés en estudios básicos para analizar la embriogénesis, debido a que se trata de un sistema muy eficiente que además proporciona un gran número de embriones en todas las etapas del desarrollo (Forster 2007), para la investigación básica en genómica, el mapeo genético (Ferrie y Caswell 2011). Así mismo la embriogénesis del polen llevada a cabo mediante el cultivo de microsporas aisladas en suspensión permite la observación y obtención de las primeras etapas de la diferenciación del embrión.

#### 1. b. 1. Sistemas *in vitro* de embriogénesis de microsporas

La embriogénesis de microsporas se puede inducir en dos sistemas *in vitro* fundamentalmente: cultivo de microsporas aisladas en un medio líquido y cultivo de anteras en medio sólido (Maluszynski et al. 2003).

El cultivo en **medio líquido de microsporas aisladas** se basa en la extracción mediante un proceso físico de las microsporas de la antera y la suspensión de éstas en un medio líquido que les aporta una fuente de carbono, sales minerales y vitaminas. En este medio en el que se encuentran las microsporas se aplica el tratamiento de inducción de embriogénesis, en el caso de la colza, un tratamiento térmico por calor a 32°C (Custers et al. 1994; Prem et al. 2012). Es en el mismo medio de cultivo en el que las microsporas se desarrollan y tiene lugar todo el proceso hasta la formación del embrión cotiledonar maduro.

El **cultivo de anteras** se ha desarrollado en numerosas especies tanto herbáceas (Bárány et al. 2005) como leñosas (Peixe et al. 2004); se basa en la colocación de las anteras, de manera individual, en una placa con medio de cultivo solidificado con agar al 8%, con acceso a una fuente de carbono, sales minerales y vitaminas, y en el que las microsporas, que se encuentran dentro de las tecas de la antera, se reprograman y forman embriones haploides cuando se somete a estas placas a un tratamiento de estrés, por ejemplo, con el caso del cultivo de anteras de alcornoque, temperatura, a 33°C. Las anteras con microsporas que responden a la inducción de embriogénesis deben transferirse a un medio nuevo periódicamente para que los embriones sigan teniendo acceso a medio fresco.

Cada sistema de cultivo presenta ventajas y desventajas frente al otro sistema. Estas son: el cultivo de microsporas aisladas no necesita ser renovado durante todo el proceso de embriogénesis, mientras que el cultivo de anteras requiere de medio fresco periódicamente, para la correcta progresión del mismo; en el cultivo, las microsporas aisladas, se encuentran en suspensión en el medio de cultivo, no hay presente ningún tejido somático de la planta original, lo cual hace más fácil el flujo de nutrientes y la observación de las fases de desarrollo de la embriogénesis desde sus primeras etapas. Mientras que en el cultivo de anteras, las microsporas se encuentran dentro de las tecas de las anteras, rodeadas de tejido somático que al degradarse puede interferir en la progresión de la embriogénesis, por lo que los embriones solo pueden observarse cuando estos emergen de la antera rompiendo las capas exteriores; otro de los factores a tener en cuenta es la frecuente contaminación del medio de cultivo, en las microsporas aisladas el medio muy rico en sacarosa por lo que es muy común que se produzcan contaminaciones en el mismo, mientras que en el cultivo de anteras el problema de la contaminación es menor salvo en el caso de árboles ya que al tratarse de un material recogido en el campo presenta diversas contaminaciones.

No obstante, el cultivo de anteras es el sistema de cultivo más empleado para producción de embriones haploides (Leal et al. 2004) por su simplicidad frente al cultivo de microsporas, en el que

es necesario realizar una extracción de las microsporas y contar con un sistema de filtrado que separe el tejido somático de las microsporas.

A pesar de sus ventajas, el cultivo de microsporas solo se ha conseguido desarrollar embriones maduros y plantas en un número limitado de especies como en colza, cebada, tabaco, trigo, manzano, café o chopo (Prem et al. 2005; Kumlehn et al. 2006; Touraev et al. 1996; Castillo et al. 2000; Höfer 2005) y es mas empleado para estudios básicos siendo los sistemas modelo más estudiados el de colza o cebada.

Para poder seguir implementando y mejorando la eficiencia y progresión de la embriogénesis de polen en más especies, es necesario que se identifiquen en primer lugar los factores genéticos y moleculares que regulan este proceso.

#### 1. b. 2. Factores que afectan a la respuesta embriogénica

Existen diversos factores que afectan a la respuesta de inducción de embriogénesis, estos pueden ser tanto de tipo endógeno como exógeno. Los más importantes son: la fase de desarrollo en la que se encuentre la microspora, el genotipo de la planta donadora de microsporas y el tratamiento inductor de embriogénesis.

Dentro de los factores endógenos el más limitante es el genotipo, ya que es uno de los factores clave que controla la respuesta de las microsporas a embriogénesis, como ya se ha demostrado en diferentes especies estudiadas, en las que se ha observado que diferentes cultivares producen respuestas distintas a la inducción de embriogénesis del polen, incluso en especies modelo en la que se observan diferencias entre variedades (Touraev 2001; Ferrie 2005; Malik 2008).

El segundo factor de más importancia en la inducción de embriogénesis es la fase de desarrollo del polen en la que se encuentre en el momento de la inducción. En la mayoría de las especies es la microspora vacuolada la fase más sensible a la inducción de embriogénesis tanto en especies modelo como en plantas no modelo, seguida del polen bicelular temprano, esto es, las fases más sensibles se encuentran alrededor de la primera mitosis del polen (Raghavan et al. 1986; Touraev et al. 2001; Maraschin et al. 2005; Ramírez et al. 2004; Bárány et al. 2005); habiéndose relacionado el estado de alta actividad de la microspora vacuolada y en el estadio previo a la mitosis con su capacidad de máxima respuesta embriogénica (González-Melendi et al. 1995; Seguí-Simarro et al. 2011; Germanà et al 2011b)

El tercer factor es el tratamiento inductor que se aplica en la fase de microspora vacuolada tardía. El más común es el calor (en general 32-33°C), no obstante también se ha descrito el frío (4°C),

ayuno, hormonas, vitaminas o el estrés osmótico como tratamientos, aunque cada especie requiere de un factor inductor determinado (Imamura et al. 1981; Kyo 1990; Touraev et al. 1997) tras el estrés algunas microsporas no responden al tratamiento inductor y no se reprograman, algunas inician programas de muerte celular programada (Rodríguez-Serrano et al. 2012), o incluso otras siguen la ruta de desarrollo gametofítica hasta polen maduro (Hosp et al. 2007; Satpute et al. 2005). También se ha detectado que algunas de estas microsporas sintetizan proteínas de choque térmico (HSP) como protección frente al estrés inductor (Cordewener et al. 1995; Zarsky et al. 1995; Smýkal et al. 2000; Seguí-Simarro et al. 2003).

Otro de los factores importantes en el desarrollo de la embriogénesis del polen, es la composición del medio de cultivo. Para algunas especies la composición de este medio de cultivo es sencilla: una fuente de energía, como la sacarosa, macro y micronutrientes y sales minerales; mientras que hay otras especies que requieren también de la adicción de vitaminas, y otros componentes que hagan prosperar el cultivo. En los casos de la cebada, patata y trigo, la fuente de carbono es maltosa, en vez de sacarosa (Scott et al. 1991; Orshinsky et al. 1990). También hay muchas especies que requieren de la adicción de reguladores de crecimiento (auxinas, citokininas o incluso una correcta proporción entre ambas) como en pimiento (Bárány et al. 2005), estos reguladores de crecimiento en ocasiones están implicados en el aumento de la cantidad de embriones formados (Smýkal et al. 2000), aunque no hay acuerdo sobre la combinación óptima, en general se usan las concentraciones más bajas posibles (Zheng et al. 2001; Liu et al. 2002).

### **1. c. Embriogénesis somática**

La definición de embriogénesis somática en términos generales es el proceso mediante el cual se forman embriones y estructuras embrionarias a partir de células somáticas. En este proceso, no es necesaria la formación de un cigoto para el desarrollo de un embrión. Este proceso fue observado por primera vez en zanahoria (Steward et al. 1958) y fue descrito por Williams y Mashewary en 1986 (Williamns y Mashewary 1986) como el proceso mediante el cual células somáticas diferenciadas o en proceso de diferenciación, haploides o diploides se desarrollan en plantas diferenciadas a través de las etapas embriogénicas típicas pero sin la fusión de gametos. Por lo tanto la embriogénesis de microsporas puede considerarse un tipo de embriogénesis somática aunque en la literatura este término se aplica a embriones derivados de sistemas muy variados en los que el embrión se origina de muy diferentes tejidos como embrión cigótico inmaduro, hoja, tallo, yemas o tejidos florales (Cardoso et al. 2010)

La propagación mediante embriogénesis somática permite la formación de muchos embriones genéticamente idénticos sin necesidad de esperar al siguiente periodo reproductivo (Leal et al. 2004).

El cultivo de distintos tipos de tejidos, explantos, en medios de cultivo con el apropiado balance hormonal y el adecuado tratamiento de inducción en la fase mas eficiente de respuesta permite inducir la formación de embriones directamente del explanto, proceso denominado *embriogénesis somática directa* (Williams y Maheswaran 1986). Mientras que si la formación de embriones se realiza mediante la formación inicial de un tejido o masa embriogénica a partir del cual se originan los embriones, entonces se denomina embriogénesis somática indirecta (Jeong et al. 1995; Ahmed et al. 1996; Hamidah et al. 1997; Jeya Mary y Jayabalan 1997), en la que normalmente los embriones se localizan en la superficie de las masas embriogénicas, en regiones periféricas. También en algunos casos, los embriones ya formados pueden ser el origen de la aparición de nuevos embriones somáticos, a este proceso en el que los embriones proceden de células de embriones se denomina *embriogénesis secundaria o recurrente* (Pedroso et al. 1993)

Los embriones somáticos se caracterizan por ser estructuras que muy pronto presentan una polaridad, mediante la formación de estructuras asimétricas. La formación de esta estructura no es bien conocida pero al igual que en el cigoto se tiene que establecer una polaridad mediada por un gradiente de auxinas entre el tejido “materno”, sea este un explanto o una masa embriogénica y el embrión (de Smet et al. 2010).

La inducción de embriogénesis somática depende del estado de desarrollo de la planta, de su genotipo, del estado de desarrollo del tejido del que se toma el explanto, del medio de cultivo en el que se desarrolla la embriogénesis y del tratamiento inductor que se le aplica. En el caso particular del alcornoque la mayoría de estudios se centran en la inducción de embriogénesis somática a partir de material muy joven o embriones cigóticos. La inducción de embriogénesis somática se ha llevado a cabo en multitud de tejidos, en hojas de plantas jóvenes (Fernández-Guijarro et al, 1995), en segmentos nodales (El Maâtaoui et al. 1990; Trinidad y Pais 2003), en cotiledones de embriones cigóticos maduros (Toribio 1986) y en embriones cigóticos inmaduros (Bueno et al. 1992; Manzanera et al. 1993).

El estrés causado por las condiciones de crecimiento *in vitro* sumadas al producido por el estrés inductor, un tratamiento por temperatura, 33°C, favorecen la iniciación de la respuesta embriogénica en diversas especies (von Arnold et al. 2002; Fehér et al. 2003; Jiménez, 2005). Las diferencias que se producen en la respuesta embriogénica entre distintos genotipos ha sido

demostrada por Merkle et al. 1995, tanto en especies herbáceas como en leñosas (Park et al. 2005; Lopes et al. 2006; Pinto et al. 2008).

#### **1. d. Aplicabilidad de la embriogénesis.**

Los sistemas de embriogénesis *in vitro* tienen varias aplicaciones tanto en investigación básica y aplicada como en procesos de mejora genética. En la embriogénesis de polen mediante la duplicación cromosómica se forman plantas homocigotas en una sola generación (Zheng et al. 2001). La formación de plantas doble-haploides es interesante ya que pueden ser una herramienta en investigación básica, en mejora genética, en proyectos de secuenciación y en programas de creación de líneas isogénicas. Las plantas haploides también pueden ser usadas en procesos de transformación genética, presentando además la ventaja de que estas plantas no segregan el transgen insertado, ya que la duplicación cromosómica se hace mediante la adicción de una droga. El empleo de estas reduce el tiempo y los costes en la producción de nuevas variedades (Liu et al. 2002) que de otra manera llevaría muchos ciclos de autopolinización mediante los sistemas de mejora convencionales.

Los programas de mejora genética en plantas herbáceas son menos complejos que en leñosas ya que su ciclo de vida es corto. Mediante embriogénesis somática se pueden emprender programas de mejora genética forestal, en los que se debe disponer de un método de regeneración clonal efectivo. Las técnicas tradicionales de propagación vegetativa más utilizadas, en especies leñosas han sido, además del enraizamiento de estaquillas, los injertos. En general, estos métodos funcionan bien cuando la planta donadora es joven, siendo más difícil cuando se trata de propagar individuos adultos, incluso imposible en muchas especies. Esto es una limitación importante, ya que una vez transcurrido el tiempo necesario para evaluar una línea clonal y determinar que es genéticamente superior y tener las características buscadas de la planta donadora ha madurado, perdiendo la capacidad para ser propagada mediante esas técnicas. Por ello es conveniente realizar la selección de los genotipos cuando las plantas son adultas y manifiestan todo su potencial genético, y por tanto es cuando resulta primordial disponer de una técnica regenerativa eficaz (Bonga 1992). Una de las aplicaciones de los programas de mejora es la micropropagación, que presenta muchas ventajas. La multiplicación *in vitro* es una técnica muy rápida para obtener plántulas, permite el cultivo de embriones y plantas libre de enfermedades, y se pueden obtener embriones y plántulas durante todo el año. Aunque también presenta algunas desventajas como son la inestabilidad genética y el paso a *ex-vitro*, punto crucial del proceso (Park 2005).

Mediante técnicas *in vitro* de embriogénesis se pueden llegar a crioconservar embriones, sin que estos pierdan viabilidad y cambios en su genoma. La conservación de germoplasma es considerada una herramienta de gran utilidad para conservar variedades de interés a largo plazo. Este sistema permite la evaluación de variedades generadas mientras que se mantiene la línea original crioprotegida (Park et al. 2005; Engelmann et al. 1994). Este proceso puede aplicarse en gran variedad de plantas tanto gimnospermas (Klimaszewska et al. 2002) como en angiospermas (Vietez et al. 201; Valladares et al. 2004).

Los procesos de embriogénesis *in vitro* son apropiados para desarrollar sobre ellos un proceso de transformación genética, ya que una modificación introducida en uno de estos embriones se mantendrá en la planta adulta regenerada. Entre las modificaciones más habituales se encuentran la introducción de genes resistentes a herbicidas, genes para una mayor eficiencia de resistencia a patógenos, un aumento de la producción, acortamiento de la fase juvenil, etc.

## **2. SISTEMA DE ESTUDIO**

### **2.a. *Brassica napus* L.**

La colza (*Brassica napus*) es una planta herbácea de la familia de las Brassicaceas con unas flores de color amarillo brillante, que vive un año aproximadamente y que puede llegar a medir hasta 1,5 m, con hojas de hasta 40 cm y que presenta las flores agrupadas en racimos de 20-60 flores que dan unos frutos en forma de silicua que contiene las semillas de unos 1.2-1.8 mm esféricas y de color oscuro. Esta planta se cultiva en todo el mundo para la producción de forraje para los animales y producción de aceite vegetal para consumo humano, aunque últimamente también se está fomentando su cultivo para la producción de Biodiesel, por lo que en los últimos años se están promoviendo los programas de mejora genética para una mayor producción de aceite.

El aceite de colza presenta en su composición el ácido erúcico, C22:1, y glicosinolatos, que son tóxicos por lo que se han obtenido variedades con menor cantidad de estos compuestos. Estas variedades fueron desarrolladas en Canadá y se le dio el nombre de CANOLA, CANadian Oil Low Acid, “aceite canadiense bajo en ácido”.

El primer esteroide con actividad hormonal fue obtenido de esta planta, el Brassinolido, que fue aislado del polen en 1970 demostrando que tenía una actividad estimuladora del crecimiento vegetal (Mitchell et al. 1970). A partir de este descubrimiento se han aislado y caracterizado decenas de compuestos con estructura similar que han mostrado diferentes grados de actividad estimuladora

de la elongación y división celular. Al conjunto de estos compuestos se les denomina Brasinoesteroides, que son considerados hormonas vegetales.

En *Brassica napus* se desarrolló el cultivo de microsporas, para generar embriones haploides y doble-haploides, en el cultivar Topas, con una elevada eficiencia de respuesta a embriogénesis (Custers et al. 1994; Custers 2003; Pechan et al. 1988; Prem et al. 2005; Prem et al. 2008). Desde entonces se ha empleado en numerosos trabajos de investigación de embriogénesis, considerándose un sistema modelo en este tipo de trabajos debido a la elevada tasa de eficiencia de respuesta a embriogénesis y la rapidez del sistema ya que tras la puesta en cultivo de las microsporas los embriones maduros se forman en 20-30 días.

## **2.b. *Quercus suber* L.**

El alcornoque (*Quercus suber*) es un árbol perteneciente a la familia de las fagáceas, se diferencia por su gruesa corteza, muy suberosa. Es una especie monoica en la que suelen aparecer las flores masculinas, amentos, y femeninas en el mismo eje floral. El árbol adulto presenta una copa baja, globosa y densa, que continúa creciendo siempre, pudiendo llegar a alcanzar los 20-25 m, y que también presenta corteza suberosa o corcho. Los alcornocales en muchas ocasiones no son diferentes individuos si no que son raíces secundarias superficiales que generan nuevos brotes y estos pueden crecer hasta convertirse en individuos adultos. El alcornoque es una especie termófila, se encuentra en climas mediterráneos y no suele soportar muy bien las heladas, por lo que normalmente no se encuentra en alta montaña. Se suele encontrar en laderas suaves soleadas orientadas al sur y con una precipitación moderada.

El corcho que caracteriza a este árbol está formado por células epidérmicas que tienen unas paredes celulares engrosadas con un alto contenido en suberina con un espesor de 2 micras. Este material tiene una gran importancia comercial debido a sus características, bajo peso, elasticidad, flexibilidad, impermeabilidad e imputrescibilidad.

El alcornoque es una especie de gran interés económico-forestal ya que es una de las principales masas forestales de España y genera gran cantidad de productos. La madera del alcornoque es muy dura y pesada y es muy apreciada en trabajos artesanales así como para su uso como leña o carbón vegetal. Las bellotas del alcornoque forman una parte importante de la alimentación del ganado. Aunque el producto más apreciado del alcornoque es el corcho, que tiene un gran interés económico en la industria debido a que la producción es limitada y sus características son insustituibles.



Los amentos, estructura floral masculina, están formado por ramilletes de anteras que se separan entre sí. Estos rametes están protegidos por unas escamas que rodean las anteras y las protegen hasta su maduración cuando se libera el polen.

El fruto es una bellota de color marrón-rojizo de tamaño variable, que está recubierta en la parte superior por una cúpula que llega a cubrir el fruto entero cuando es joven y solo un tercio cuando el fruto está maduro, y que presentan una maduración escalonada. La producción de bellotas varía mucho de unos árboles a otros y sobretodo varía mucho de un año a otro ya que esta especie se caracteriza por ser vecera, esto indica una gran producción en el mismo árbol en años no consecutivos.

Debido a esta gran importancia forestal y económica se han promovido estudios para aumentar su superficie y producción, como alcornoques que presenten un crecimiento más rápido, con más cantidad y mayor calidad de corcho, resistente a enfermedades y a condiciones ambientales, aumento de la producción de frutos, etc...; ya que las especies forestales mediterráneas no permiten que se apliquen los programas clásicos de mejora debido al largo periodo de tiempo hasta el periodo reproductivo, las actuaciones de mejora pasarían por una multiplicación mediante micropropagación de embriones doble-haploides, procedentes de la embriogénesis de polen, o de embriones somáticos seleccionados.

Además los programas de mejora presentan dificultades añadidas debido a que las bellotas del alcornoque son recalcitrantes a la conservación, no hay una clara correlación entre las características que se observan en los individuos juveniles y los adultos y la tardía madurez sexual, además es una especie que presenta una buena fructificación solo cada uno o dos años; y la imposibilidad de obtener líneas puras mediante métodos convencionales. En *Quercus suber* se han desarrollado sistemas *in vitro* de embriogénesis de polen (Bueno et al. 2003) y somáticos a partir de embriones cigóticos (Manzanera et al. 1993; García-Martín et al. 2005) con buenas tasas de inducción. Mediante la embriogénesis de polen y somática se podrían salvar muchas de estas dificultades, ya que por ejemplo mediante la embriogénesis del polen se pueden obtener individuos homocigotos, líneas puras para los programas de mejora, y mediante embriogénesis somática se pueden clonar genotipos de árboles que presenten características de interés.

En este trabajo se estudian cambios en factores clave implicados en el proceso de reprogramación celular y el inicio de embriogénesis, como son las **marcas epigenéticas, la auxina y la pared celular**, los cuales se tratan más detalladamente en los siguientes apartados de la introducción. Además, se analizan los puntos en común que presenta la embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros frente a la embriogénesis de polen, y se caracterizan **marcadores tempranos**

presentes en las células del embrión al inicio de su desarrollo en comparación con las células del explanto o de las masas embriogénicas que lo originan.

### **3. MARCAS EPIGENÉTICAS**

La epigenética estudia los cambios heredables en el fenotipo que no implican un cambio en la secuencia de DNA. Así la estructura y función de la cromatina está regulada por múltiples mecanismos epigenéticos, entre los que se incluyen metilación del DNA, modificaciones post-traduccionales de histonas e interacciones con pequeños RNAs interferentes, siRNAs (Kouzarides 2007, Leeb y Wutz 2012). Las marcas epigenéticas son modificaciones covalentes que se producen en la cromatina (DNA o histonas). Estas marcas son muy variadas tanto en su modo de acción como en su lugar de acción: metilación de citosinas del DNA, metilación de histonas, acetilación de histonas, sustitución de variantes histónicas e incluso regulación mediante RNA (Liu et al. 2010). Estos cambios en el estado conformacional de regiones génicas que pueden afectar a estados de la cromatina se traducen en cambios en la condensación-descondensación de la cromatina, lo que hace que esta sea más o menos accesible para las herramientas de transcripción, modulando la expresión génica.

Estas marcas son eventos muy dinámicos y en plantas juegan un importante papel en numerosos procesos: el desarrollo del embrión, la floración, la interacción planta-patógeno, la senescencia así como la variación somaclonal (Kouzarides 2007; Law et al. 2004; Leeb y Wutz 2012).

Las marcas epigenéticas son un cambio heredable por lo que pueden ser transmitidas a la siguiente generación durante la división celular, pero el hecho de ser unos eventos dinámicos hacen que estas marcas puedan ser revertidas dando así la capacidad a la planta de adaptarse al medio que la rodea y regular los procesos de desarrollo. (Yaish et al. 2011, Köhler et al. 2012).

El hecho de que las plantas sean organismos sésiles que tienen que adaptarse al entorno en el que se encuentran, hace que necesiten una serie de herramientas que adapten su programa genético a esas condiciones para asegurar su supervivencia y correcto desarrollo, siendo las marcas epigenéticas estas herramientas rápidas y reversibles de modificación del genoma.

Además del control genético, numerosas evidencias indican un control epigenético de los procesos de desarrollo y diferenciación en plantas (Grant-Downton y Dickinson 2006; Xiao et al. 2006). Existen datos que indican que los cambios epigenéticos modulan la morfogénesis y revigorización de tejidos vegetales adultos, así como la embriogénesis cigótica de especies leñosas (Bitonti et al.

2002; Fraga et al. 2009). La reprogramación y adquisición de totipotencia celular conlleva la represión y/o activación de numerosos genes asociados al nuevo programa de desarrollo y las marcas epigenéticas parecen intervenir en la regulación de expresión génica a nivel global en el genoma. Estudios previos en nuestro grupo de investigación durante el desarrollo del polen y su reprogramación a embriogénesis han revelado la existencia de una reprogramación epigenética, mediante cambios en la metilación global de DNA en microsporas de *Brassica napus* y *Hordeum vulgare* (Solís et al. 2012; El-Tantawy et al. 2014)

También hay durante la desdiferenciación de las células somáticas y la iniciación de la embriogénesis somática muchos mecanismos epigenéticos implicados incluyendo cambios en el patrón de metilación del DNA y modificaciones post-traduccionales de histonas (Smertenko y Bozkov 2014). La metilación del DNA regula el silenciamiento génico y juega un papel vital en la embriogénesis somática. Se ha demostrado que hay regiones promotoras que se des-metilan durante la iniciación de la embriogénesis (Shibukawa et al. 2009). Las modificaciones post-traduccionales de histonas regulan la expresión de numerosos genes. Algunos trabajos han sugerido que la regulación del paso de una célula proliferante a una célula embriogénica está promovida por la acetilación de histonas (Ogas et al. 1999). Tratamientos con Tricostatina A, un inhibidor de la histona de-acetilasa, en cultivos embriogénicos de *Picea abies* reprime el desarrollo del embrión y reduce también la transcripción de factores clave de la regulación de embriogénesis (Uddenberg et al. 2011).

Trabajos recientes han mostrado que las marcas epigenéticas reprimen la formación del callo en tejidos somáticos (Ikeuchi et al 2013), pero todavía permanecen sin esclarecer muchos de los mecanismos genéticos y epigenéticos que controlan la embriogénesis somática y de microsporas.

Las marcas epigenéticas de la cromatina se pueden clasificar en dos grandes grupos: aquellas que actúan directamente sobre la hebra de DNA, como es la metilación del DNA, y aquellas que actúan sobre las histonas que forman el nucleosoma, como son la metilación o acetilación de histonas.

### **3.a. Metilación del DNA**

La metilación del DNA es una marca epigenética que consiste en la incorporación de un grupo metilo en el carbono 5 del anillo del nucleótido citosina. En plantas, esta marca se puede encontrar en regiones del DNA que presenten secuencias tipo CG, GHC (donde H puede ser Adenina, A, Citosina, C, o Timina, T) e incluso en sitios CHH.

En estudios recientes se ha comprobado que la densidad de metilcitosinas en genes es mucho menor y que está limitada a sitios CG mientras que la densidad de metilcitosinas que se presenta en los

transposones es mucho mayor y se localiza en sitios CG y no-CG (Zhang 2006), por lo que la metilación del DNA se considera una marca epigenética de silenciamiento génico.

La metilación del DNA en aquellos lugares donde la hebra codifica genes es un mecanismo muy flexible para controlar la expresión o represión de estos genes en cada una de las células, de un mismo organismo, que presentan la misma secuencia de DNA (Chen et al 2010). Aunque también se ha demostrado que la metilación de citosinas en la región del promotor de esos genes resulta más efectiva como marca epigenética para reprimir la expresión de esos genes que la metilación de la secuencia del propio gen (Hsieh 1997).

Como herramienta de control de la expresión génica se ha demostrado que la metilación del DNA es muy variable dependiendo del estado del desarrollo de la planta o las condiciones ambientales en las que se encuentre (Mirouze y Paszkowski 2011). Como ejemplo de la implicación de la metilación del DNA en mecanismos celulares, Brero et al. 2005 ha demostrado que la metilación del DNA está implicada en la agrupación de los centrómeros; las regiones centroméricas y teloméricas de muchos cromosomas están permanentemente metiladas (Barbin 1994; Montpellier 1994).

Al ser, la metilación del DNA, una marca epigenética heredable ésta pasa a la siguiente generación tras la replicación del DNA en la hebra parental, añadiéndose después la metilación correspondiente en la hebra complementaria utilizándola como patrón, esto hace que esta marca epigenética sea perdurable.

En plantas se ha descrito que la metilación del DNA es vital para el correcto desarrollo y crecimiento (Meijón et al. 2009). Estudios recientes llevados a cabo por nuestro grupo han revelado cambios en la metilación del DNA durante la muerte celular programada del tapetum y durante el proceso de microgametogénesis en colza (Solís et al. 2012, 2014). Durante la embriogénesis del polen, trabajos realizados en colza y cebada revelan que la reprogramación de la microspora está asociada con un descenso en el grado de metilación global del DNA y la reconfiguración del epigenoma (Solís et al. 2012; El-Tantawy et al. 2014).

La metilación del DNA constituye por tanto una herramienta de adaptación rápida a las condiciones externas, así como un mecanismo regulador de los procesos de desarrollo normal de la planta.

### 3.b. Modificaciones de Histonas

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas que forman el nucleosoma son la otra gran herramienta epigenética. La capacidad que tienen estas modificaciones de histonas de organizar el entorno cromatínico permite que sea capaz de regular la condensación-descondensación de la cromatina así como procesos nucleares como la replicación, transcripción y reparación del DNA. La función de la modificación de histonas puede dividirse en dos categorías: el establecimiento de conformaciones de cromatina y la regulación de actividades en el DNA. Para llevar a cabo la organización de un entorno global de cromatina podemos diferenciar distintos estados conformacionales de la cromatina, la eucromatina, donde el DNA permanece más accesible para la maquinaria de la transcripción y la heterocromatina donde el DNA no está accesible. Para la regulación de actividades del DNA, como es la transcripción de un gen, la reparación del DNA, o actividades más globales como la replicación del DNA es necesario el reclutamiento de maquinaria para la descondensación del DNA, manipularlo y devolverlo a su estado original (Kouzarides 2007).

#### Tipos de modificaciones de Histonas

Dentro de las modificaciones que pueden sufrir las histonas hay varias clases:

**-Acetilación:** La acetilación de las histonas se produce normalmente en la lisina de la cola N-terminal de las histonas H3 y H4 ya que se encuentra más accesible a las modificaciones, esta marca se encuentra casi invariablemente asociada con la activación de la transcripción ya que se ha detectado la presencia de residuos de lisina acetilados en los genes activamente transcritos; esta acetilación modifica la interacción DNA-histona y hace que el DNA sea más accesible a la maquinaria de transcripción (Xu et al 2005; Early et al 2007).

Este proceso de regulación epigenética es llevado a cabo por enzimas denominadas histona acetilasas o acetil-transferasas, que se dividen en 3 grandes familias: GNAT, MYST y CBP/p300 (Sternier y Berger 2000). Las histonas acetil-transferasas, HAT, pertenecientes a la primera familia y a la cual también pertenece la BnHAT, que se estudia en esta tesis doctoral, fueron aisladas por primera vez en 1990, purificadas de *Tetrahymena termopila* (revisión en Yuan et al 2012). Aunque en un primer momento fueron caracterizadas como enzimas que tenían actividad acetiltransferasa citoplasmática, posteriormente se descubrió que su función era nuclear (Poveda et al 2004). Hasta la fecha las HATs son las enzimas mejor caracterizadas estructural y bioquímicamente dentro de las enzimas que llevan a cabo modificaciones post-traduccionales en las histonas y a pesar de las divergencias de

secuencia, todas las familias presentan un núcleo conservado con 3 láminas  $\beta$  y una larga  $\alpha$ -hélice paralela (Yuan 2012). Son unas enzimas que contribuyen a muchos procesos de desarrollo y adaptación, en combinación con las histonas de-acetiladas (Pandey et al. 2002; Xu et al. 2005; Liu et al. 2012b).

El grado de acetilación de histonas y la actividad transcripcional se encuentran relacionadas ya que hay factores de transcripción que pueden procesar actividades acetiltransferasa y deacetilasa (Allfrey et al. 1964)

Se ha descrito que la actividad acetiltransferasa de histonas es muy alta durante la germinación en el embrión de maíz (Lusser et al 1999).

**-Desacetilación:** La desacetilación es el proceso contrario a la acetilación de histonas por lo que se encuentra relacionado con la actividad transcripcional. Esta actividad enzimática es llevada a cabo por las desacetilasas de histonas, HDAC, que están separadas en 3 familias: la clase I, la clase II y la clase III NAD-dependiente perteneciente a la familia Sir (Kouzarides 2007). Estas enzimas están presentes en muchas rutas de señalización y forman parte de algunos complejos de represión cromatínica. Estas enzimas no presentan una gran especificidad por ningún residuo en concreto, solo se han encontrado algunas histona deacetilasas en levaduras y otra en humanos perteneciente a la familia Sir que tiene preferencia por un determinado residuo (Vaquero et al. 2006).

**-Metilación de lisinas:** Esta metilación es llevada a cabo por distintas enzimas llamadas metil-transferasas de lisinas de histonas o “histone lysine methyltransferases” o HKMTs (Liu et al. 2012). Estas enzimas, al contrario que las acetilasas de histonas, presentan una enorme especificidad en su actividad, que solo realizan sobre un determinado residuo, e incluso a un determinado grado de metilación (Kouzarides et al. 2007). La función de esta marca epigenética depende del residuo que se modifique ya que puede producirse una activación o una represión de la transcripción (Bannister y Kouzarides, 2005). Las modificaciones que están implicadas en la activación transcripcional son la metilación de la Lisina 4, 36 y 79 de la histona H3 (H3K4, H3K36 y H3K79). Mientras que las implicadas en la represión transcripcional son la metilación de la lisina 9 y 27 de la histona H3 (H3K9 y H3K27), y la metilación de la lisina 20 de la histona H4 (H4K20). La trimetilación en H3K4, H3K36 y H3K79, da como resultado una configuración abierta de la cromatina, que además se caracteriza por sus altos niveles de acetilación de histonas, mediada por HATs, lo que permite que se transcriban los genes presentes en ese segmento de la hebra del DNA. Mientras que la cromatina condensada no presenta estas acetilaciones y además

presenta metilaciones en H3K9, H3K27 y H4K20 (Kouzarides 2007, Liu et al. 2010). En Arabidopsis la metilación de histonas predominante en la lisina 9 son las formas monometiladas y dimetiladas (H3K9me1 y H3K9me2), las cuales se han localizado en regiones de secuencias repetidas, y transposones, regiones asociadas con la heterocromatina (Lippman et al. 2004, Johnson, 2004). También se ha demostrado que la metilación de H3K9, y la interacción de ésta con la metilación del DNA, son esenciales para el mantenimiento del silenciamiento transcripcional y el mantenimiento de la estabilidad del genoma (Vaillant et al. 2007). Así mismo también se ha visto que la trimetilación de la lisina 27 (H3K27me3), reprime la embriogénesis y la formación de meristemos en callos de varios tipos de plantas (Ikeuchi et al. 2013). También se ha descrito como las proteínas tipo Polycomb mediante su actividad metiltransferasa mantienen la represión de determinados genes en el desarrollo del embrión y del endospermo en Arabidopsis (Köhler et al. 2003).

**-Desmetilación de lisinas:** Al igual que para la acetilación, las enzimas metiltransferasas de histonas también presentan sus antagonistas. Se han encontrado de-metilases de lisina que, debido a la alta especificidad que presentan, tanto en el residuo sobre el que actúan como en el estado de metilación, proporcionan un alto grado de control de la metilación (Shi y Whetstine 2007). Esto, unido al hecho de que la actividad de estas enzimas también está influenciada por las proteínas a las que se unen (Lee et al. 2005), y que dependiendo de si actúan sobre las marcas que producen activación o represión de la transcripción, hacen del proceso de metilación de histonas uno de los más complejos e intrincados sistemas de regulación epigenética.

**-Otras modificaciones epigenéticas en histonas:** como la metilación de argininas, deiminación y ubiquitinación/desubiquitinación. De estas modificaciones aún hay pocos datos de su función en plantas, así como del efecto que producen sobre la transcripción.

**-Metilación de argininas:** este tipo de modificación epigenética puede ser, al igual que la metilación de lisinas, activadora o represora de la transcripción. Las enzimas que llevan a cabo este proceso son reclutadas en los promotores por distintos factores de transcripción (Lee et al. 2005)

**-Deiminación:** Este tipo de modificación epigenética es la contraria de la metilación de arginina, ya que lo que se produce es una conversión de arginina en citrulina, que cuando se encuentra de este modo no es capaz de metilarse por lo que es la antagonista de la potencial activación de la metilación de la arginina (Lee et al. 2005).

-Ubiquitinación/Desubiquitinación: La ubiquitinación es una modificación epigenética que se produce sobre las histonas 2A y 2B (H2A y H2B), y se relaciona con la activación transcripcional (Wang et al. 2006). De hecho la ubiquitina es una subunidad del complejo acetiltransferasa que es necesario para la activación de la transcripción. Mientras que la desubiquitinación está implicada en procesos de represión transcripcional. La ubiquitinación en la lisina 119 de la histona H2A (H2AK119ub), junto con la acetilación de histonas H3Ac y H4Ac, hacen que se active la ruta embriogénica en callos de diversas especies (Ikeuchi, 2013)

**Figura 2:** Esquema que representa las distintas modificaciones de histonas, indicando la actividad transcripcional de esa región. Esquema obtenido de Bártová et al. 2008.

Las marcas epigenéticas regulan la expresión genética mediante el balance de diversas modificaciones covalentes en DNA e histonas; de forma genérica, la expresión génica esta activada



por la acetilación, fosforilación y ubiquitinación de histonas, mientras que es reprimida por la metilación de DNA, metilación de histonas en H3K9 y H3K27, biotinilación y sumoilación.

#### 4. AUXINAS

Las hormonas vegetales o reguladores del crecimiento vegetal, “Plant Growth Regulators” (PGR), tienen un papel crucial en los procesos del crecimiento y desarrollo vegetal, tanto *in vitro* como *ex vitro* (Fortes et al. 2005), entre ellos el desarrollo del embrión; entre todas las hormonas implicadas en dicho proceso la auxina tiene el papel predominante desde las primeras etapas del embrión cigótico (Chen et al. 2010).

La auxina es una fitohormona, que se encuentra en la planta de manera predominante en forma de ácido indol-3-acético, “Indole-3-acetic acid” (IAA). Es una molécula que funciona como coordinadora de la señal en la regulación del desarrollo vegetal, con funciones clave en el crecimiento del tallo y los coleóptilos (Prashad y Dhonukshe 2013), la iniciación de las raíces laterales (Himanen 2002), la formación de raíces laterales mediante un mecanismo con oscilamiento génico (Moreno-Risueño et al. 2010), y también en la formación del embrión, desde las primeras etapas (Chen et al. 2014) su polarización y diferenciación (Möller y Weijers 2009; Rademacher 2012). Se ha conseguido detectar señal de auxina en la superficie apical del embrión cigótico desde el momento en el que se empiezan a diferenciar tejidos y áreas apareciendo un máximo de señal en la punta de los cotiledones, que coincide con la región de máxima biosíntesis de auxina (Chen et al. 2010). También se ha demostrado (Alonso-Ramírez et al. 2009) que otras hormonas y su interacción también juegan un papel importante en la respuesta al estrés por temperatura.

Los mecanismos moleculares básicos que controlan la biosíntesis de auxina, su transporte y señalización están conservados entre mono y dicotiledóneas (McSteen et al. 2010). En los últimos años se han descubierto diferentes rutas en las que la auxina es percibida por la célula mediante un complejo sistema de receptores específicos que puede modificar la expresión génica (Rademacher et al. 2011, 2012; Peer et al. 2013). Muchos aspectos de la acción de las auxinas dependen de su biosíntesis a nivel local y su distribución diferencial a determinados tejidos mediante el transporte direccional entre células (Petrášek y Friml 2009).

Las evidencias del papel de la auxina en la formación y desarrollo del embrión se han obtenido fundamentalmente por estudios en embriones cigóticos en *Arabidopsis* mediante el análisis de expresión del promotor sintético de respuesta a auxina DR5; con este abordaje se ha conseguido

detectar señalización de auxina en la célula apical inmediatamente después de la primera división del cigoto (Friml 2003). Por otra parte, el estudio de los genes de las proteínas transportadoras de auxina PINs, y de una gran variedad de mutantes de *Arabidopsis* (Teale et al. 2006; Robert et al. 2013) han revelado la importancia del transporte polar de auxina como elemento regulador de sus funciones. Pero la información en otras plantas es muy limitado y habitualmente procede de sistemas de embriogénesis somática *in vitro*, muchos de los cuales usan reguladores de crecimiento en los medios de cultivo (Larsson et al. 2008; Hakman et al. 2009, Abrahamson et al. 2012). En este sentido, la embriogénesis del polen constituye un sistema más idóneo para analizar la función de la auxina durante la embriogénesis ya que el proceso de inducción se realiza sobre una única célula que se reprograma y da lugar a un embrión que se desarrolla y diferencia en un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento (Prem et al. 2012).

El transporte intercelular del IAA esta mediado por proteínas de transporte llamadas PIN, que han sido identificadas como elementos clave en la regulación de los procesos mediados por auxinas. El flujo de auxinas entre las células es proporcional al grado de expresión de las proteínas PIN debido a su función en el transporte polar de auxinas, ya que estas proteínas se encuentran, en mayor medida, localizadas en la parte basal de las células. Se ha detectado que durante el proceso de embriogénesis cigótica desde la etapa de una célula a la de 32 células, normalmente considerado embrión globular, las proteínas PIN1 se localizan por todo el embrión sin una polaridad detectable, mientras que a partir de esta etapa, PIN1 se encuentra con una distribución polarizada localizándose en la parte basal de las células provasculares (Chen et al. 2010).

La abundancia de las proteínas PIN depende en gran medida de la cantidad de auxinas, ya que se produce un efecto de retroalimentación entre ellas, de tal manera, que una alta cantidad de auxinas induce la expresión de los genes de las proteínas PIN (Prashad y Dhonukshe 2013).

El complejo sistema de transporte de auxinas puede ser bloqueado mediante el uso de sustancias que actúan como bloqueantes de este transporte, como es el “N-1-naphthylphthalamic acid” (NPA) que es un inhibidor del flujo de salida de auxina de la célula, posiblemente mediante interacción con la proteína PIN1 aunque no se conoce su mecanismo exacto de acción.

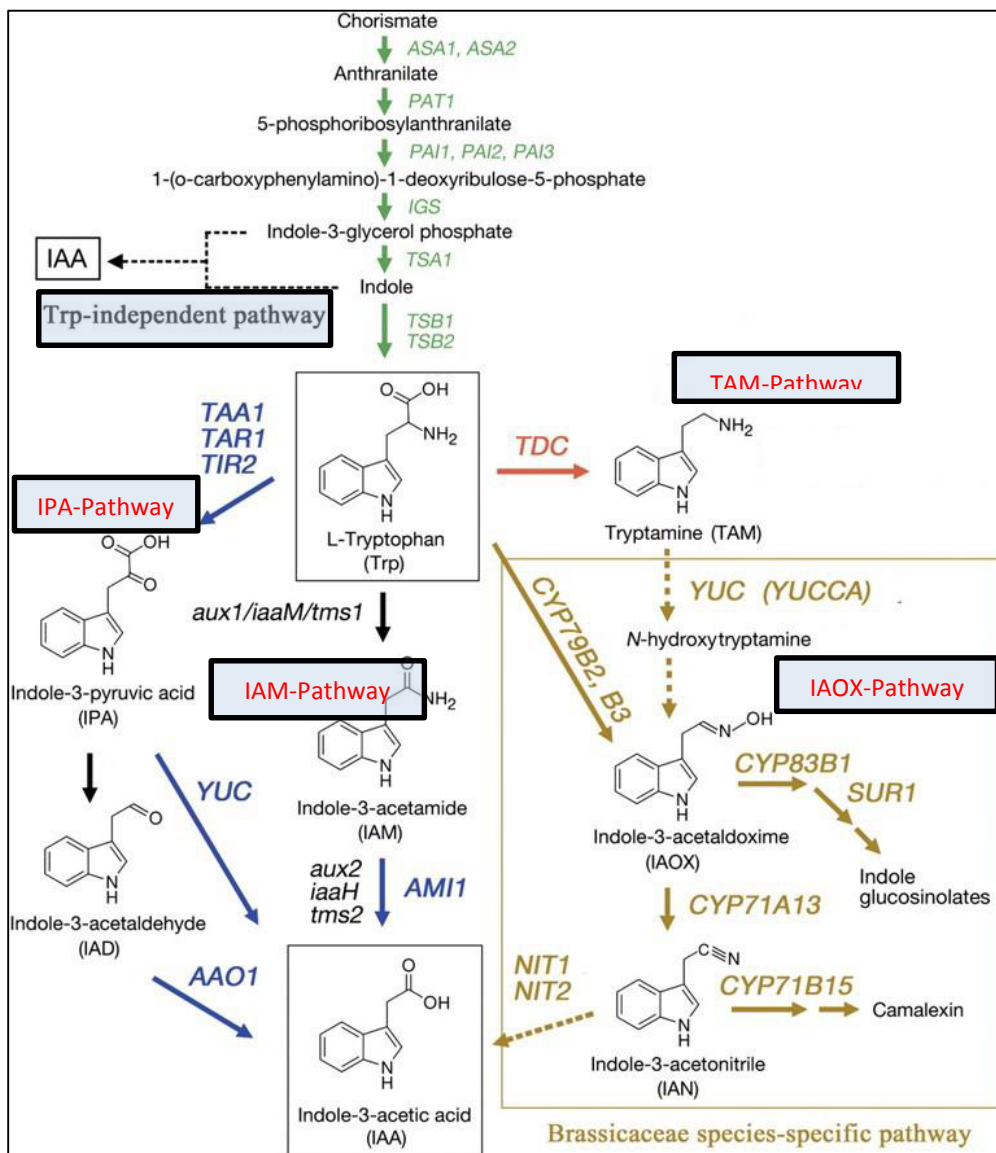
La implicación del transporte polar de auxinas, “Polar Auxin Transport” PAT, en la embriogénesis somática ha sido estudiada usando NPA que inhibe el transporte y produce cambios en la formación del embrión en muchas especies vegetales (Liu et al. 1993; Hadfi et al. 1998; Hakman et al. 2009). Además se ha demostrado que tiempos largos de exposición a estos inhibidores del transporte o la aplicación de auxinas sintéticas producen defectos severos en el desarrollo normal del embrión, entre los que se incluyen embriones con forma de pelota sin un eje apical-basal

discernible y embriones con una estructura anormal, con un polo radicular no funcional y forma de copa (Friml, 2003; Larsson et al. 2008). También se ha demostrado que tras tratamientos con NPA en embriones somáticos de pino, en los que el proceso sucede con la formación de suspensor, se produce un aumento en la frecuencia de aparición de suspensores supernumerarios (Abrahamsson et al. 2012), al igual que en los embriones somáticos de abeto noruego en los que los tratamientos con NPA producen un aumento del contenido en IAA endógeno, divisiones anormales y un descenso en la muerte celular programada de las células del suspensor, lo que hace que se produzcan masas embriogénicas a partir de éste (Larsson et al. 2008)

El (P-chlorophenoxyisobutiric acid) PCIB es un antagonista de las auxinas que inhibe su acción y por lo tanto la presencia de este compuesto bloquea los procesos inducidos por auxinas (Xie et al. 2000). Pero, sin embargo, esta droga no altera el flujo de entrada o de salida de auxinas (Oono et al. 2003) ya que no interacciona con las proteínas PIN. Debido a la semejanza estructural del PCIB con la auxina se produce una competencia por el receptor de auxinas lo que produce una distorsión de la señalización (McRae y Bonner, 1953; Xie et al. 2000), aunque el mecanismo molecular de inhibición mediante el PCIB no está todavía muy bien caracterizado (Oono et al. 2003). El PCIB ha sido usado para analizar la acción del IAA en diferentes procesos del desarrollo, por lo que constituye una herramienta muy útil en la búsqueda de los mecanismos de percepción de auxinas, la transducción de la señal y su papel en el desarrollo (Oono et al. 2003; Ahmadi et al. 2012). Los tratamientos cortos con PCIB en cultivos de embriones somáticos de diferentes especies de coníferas dan como resultado una reducción en la proliferación y un incremento en la calidad de los embriones maduros (Ahmadi et al. 2012). Mientras que tratamientos largos o con una alta concentración de PCIB da como resultado la formación de embriones defectuosos o aberrantes (Ahmadi et al. 2012).

La hormona vegetal auxina está representada mayoritariamente por el IAA, que puede ser sintetizado en la célula por dos rutas principales. Una ruta independiente de Triptófano y otra ruta dependiente de Triptófano, que a su vez se divide en 4 rutas: la ruta del indol-3-acetamida (IAM), la del ácido indol-3-piruvico (IPA), la de la triptamina (TAM) y la del indol-3-acetaldoxime (IAOX) como se puede ver en la figura 3 (Mano y Nemoto 2012). En los últimos años se ha demostrado la prevalencia de la ruta del IPA en la mayoría de las especies estudiadas hasta ahora (Brumos et al. 2014). Sin embargo las diferentes especies usan distintas rutas de síntesis, ajustando las rutas a sus necesidades metabólicas. Se ha demostrado que la ruta del IAOX tiene poca relevancia en muchas especies excepto en las Brassicaceas, entre las que se encuentran Arabidopsis y la colza. Es en esta

ruta en la que intervienen, entre otras enzimas las nitrilasas (NITs) que convierten el indol-3-acetonitrilo, IAN, en IAA.



**Figura 3:** Esquema que representa la síntesis de Ácido indol-acético, IAA, mediante las posibles rutas. Modificado de Mano y Nemoto 2012.

Se han identificado varios genes de NITs en *Arabidopsis* (Mano y Nemoto 2012) y *Brassica* (Ishikawa et al. 2007). Los estudios de expresión de los genes NIT ya han sido usados con anterioridad para analizar la biosíntesis de IAA en relación a la función de la auxina durante los procesos de desarrollo (Ishikawa et al. 2007).

Debido a que se ha demostrado que el transporte de auxinas tiene un papel clave en la formación y desarrollo del embrión, en este trabajo se analiza el efecto que la droga inhibidora de transporte polar auxínica, NPA, tiene sobre la embriogénesis del polen de *Brassica napus* al añadirla al medio de cultivo en tres concentraciones 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 40  $\mu$ M NPA, una concentración suave, media y alta respectivamente. Así como también se analizan los efectos que produce el bloqueo de la señalización de auxinas mediante la adición de PCIB en el medio de cultivo en tres concentraciones diferentes: 5, 10 y 20  $\mu$ M. También se analiza la expresión del gen, el BnNIT2, que codifica la enzima del último paso de la ruta IAOX en Brassicaceas por lo que resulta crucial para la biosíntesis de IAA en estas plantas y la distribución de auxina endógena en los embriones de polen de *Brassica napus*.

## 5. PARED CELULAR Y PECTINAS

La pared celular de plantas es una estructura típica de la célula vegetal formada por capas, muy organizadas que dan rigidez y soporta cambios osmóticos de presión entre otras funciones. La pared celular es una envoltura externa que rodea la membrana plasmática de las células vegetales. Esta pared es una estructura muy dinámica, con una composición compleja que influye en el crecimiento y desarrollo de la célula vegetal y que también influye en la determinación del tamaño y forma de la célula, en la comunicación intercelular y la comunicación con el entorno (Knox et al. 2008).

La pared celular está formada por tres capas y se forma a partir de la lamina media que proviene de las pequeñas vesículas del Golgi que contienen pectinas en la telofase, a ambos lados se depositan celulosa, hemicelulosa y pectinas que constituyen la pared primaria; dependiendo del tipo celular y etapa del desarrollo se puede depositar a ambos lados de la pared secundaria que puede incluir lignina, xilanos, etc., está situada a ambos lados por la membrana plasmática, adyacente a los protoplasmas de las dos células. La pared primaria es la más externa y es la que se forma justo después de la división celular. La composición de esta capa son microfibrillas de celulosa embebidas en sustancias pépticas y proteicas, enzimas y proteínas estructurales, que varían su proporción, composición y distribución durante los procesos de crecimiento y diferenciación celular (Bárány et al. 2010). La pared secundaria: es la capa que se encuentra más próxima a la membrana plasmática. Se forma en algunas células una vez que el crecimiento celular se ha detenido y se especializa el tipo celular. La composición de esta capa es principalmente fibras de celulosa y hemicelulosa. Y la lámina media: es una estructura formada por sustancias pépticas principalmente, se encarga de mantener la cohesión entre las paredes primarias, por lo que se encuentra más externa, sirviendo de cohesión entre las dos células contiguas.

Los componentes polisacáridicos de la pared celular están divididos en 3 grupos: celulosa, hemicelulosa y pectinas. La celulosa es el principal polisacárido de la pared celular. Esta molécula es un polímero de (1,4)-  $\beta$ -D-glucosa que se dispone en forma de microfibrillas, este polímero confiere la rigidez estructural y la resistencia de la pared celular mediante la interacción entre la celulosa y los glucanos que se entrelazan, figura 4. La hemicelulosa está formada mayoritariamente por xiloglucano, llegando a tener un porcentaje del peso seco de la pared celular primaria del 30%. La modificación de los xiloglucanos es un proceso clave para la expansión celular durante el crecimiento celular (Bárány et al. 2010). Las pectinas, el tercer polímero de la pared celular primaria, es el principal componente en especies dicotiledóneas donde alcanza hasta un 30-35% del peso seco de la pared celular (Smith y Harris, 1999; Pelloux et al. 2007).

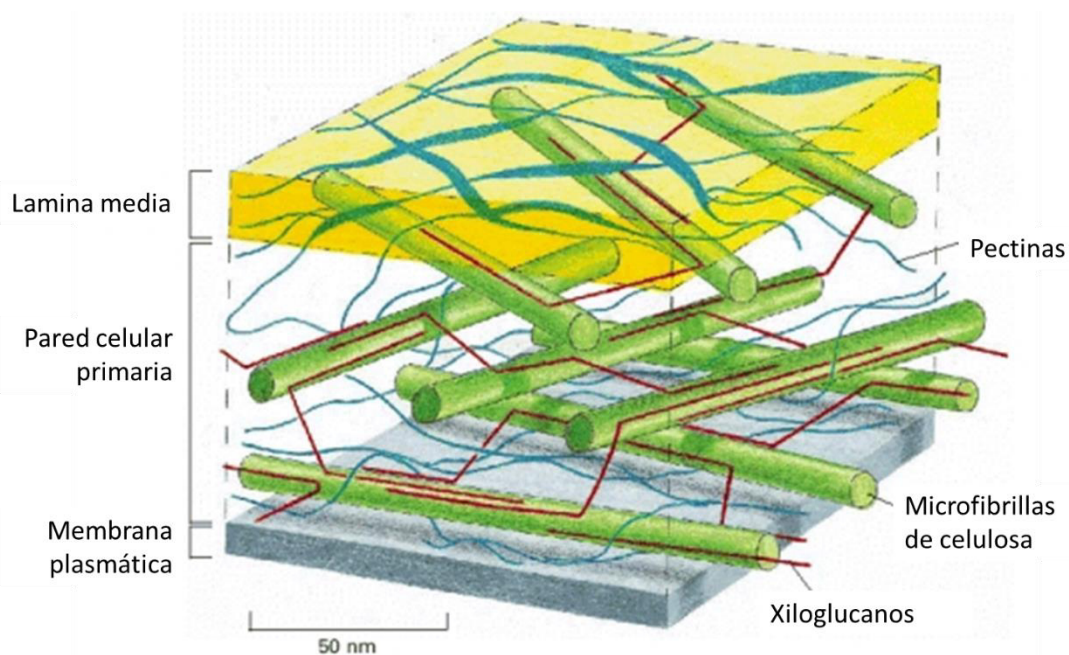
Las pectinas son una familia compleja de polisacáridos que tienen en común la presencia de ácido galactourónico (GalA) y rhamnosa (Rha) (Willats et al. 2001). Las pectinas se diferencian en 4 dominios de polisacáridos: homogalacturonano (HGA), rhamnogalacturonano I (RGI), rhamnogalacturonano II (RGII) y xilogalacturonano (XGA), que se diferencian en la estructura de la macromolécula y en la gran diversidad de sus cadenas laterales (Willats et al. 2006; Pelloux et al. 2007; Caffall y Mohnen 2009). La estructura de las pectinas es alterada de forma muy significativa por enzimas específicas de la pared celular, ya que es necesario una remodelación constante durante el desarrollo (Willats y Knox, 1999).

El HGA, principal componente pectídico, es metil esterificado en el Golgi por pectinmetiltransferasas y es secretado a la pared celular en una forma altamente esterificada (70-80%) (O'Neill 1990). Allí los grupos metil-ester pueden ser eliminados por la enzima Pectinmetilesterasa (PME), que a su vez está regulada por el pH de la pared celular (Pelletier et al. 2010). La proporción de pectinas esterificadas y no esterificadas y su distribución en la pared de las células vegetales está relacionada con muchos procesos del desarrollo (Goldberg et al. 1986; Dolan et al. 1997; Hasegawa et al. 2000; Domozych et al. 2006), con la adhesión celular y tiene esta proporción un papel importante en las propiedades mecánicas de las células vegetales (Ryden et al. 2003; Baluška et al. 2010), ya que en caso de que las pectinas se des-esterifiquen se forman puentes de calcio que confieren mayor rigidez a la pared celular, se ha descrito que su proporción está relacionada con la proliferación y la diferenciación de paredes celulares (Bárány et al. 2010).

Se han observado durante la embriogénesis somática cambios en varias estructuras y componentes celulares, como son los cambios en la pared celular que sufre modificaciones en su estructura y composición molecular (Malinowski y Filipecki 2002). Estos cambios son necesarios para el mantenimiento de la arquitectura celular y la determinación de los planos de división (Malinowski

y Filipecki 2002). Además de ser responsable de la forma y arquitectura celular, la pared celular también lo es de la comunicación con las células vecinas, a través de los plasmodesmos contruidos de cisternas del retículo endoplasmático (López-Sáez et al. 1966 revisión en Robinson et al. 2006).

Se ha demostrado que las células secretan a la pared celular factores que actúan como señales que estimulan la embriogénesis, ya que al aislar alguno de estos factores y añadirlo a cultivos con una baja densidad embriogénica, estos cultivos respondieron de manera notable (de Vries et al. 1988; Hari 1980).



**Figura 4:** Esquema de la pared celular (Alberts et al. 2002)

Se ha descrito que durante el desarrollo, la diferenciación celular aumenta la presencia de pectinas no-esterificadas en la pared celular, y una mayor proliferación celular se encuentra ligada a una mayor cantidad de pectinas altamente esterificadas en raíces embriones de pimiento (Bárány et al. 2010<sup>a</sup>) y de colza (Solís 2012).

En esta tesis doctoral se ha estudiado la proporción de pectinas esterificadas frente a las no esterificadas durante el proceso de embriogénesis *in vitro* del alcornoque en dos rutas embriogénicas, mediante el uso de anticuerpos que reconocen pectinas no-esterificadas (JIM5) y pectinas esterificadas (JIM7), (Dolan et al. 1997).

## **OBJETIVOS/OBJECTIVES**





## OBJETIVOS

1. Caracterización de los perfiles de marcas epigenéticas de histonas y enzimas asociadas durante la inducción de embriogénesis de polen en *Brassica napus*.

a. Localización *in situ* de la histona dimetilada H3K9me2 durante el inicio y progresión de la embriogénesis de polen.

b. Localización *in situ* de las histonas acetiladas H3Ac y H4Ac, durante el inicio y progresión de la embriogénesis de polen.

c. Análisis del patrón de expresión temporal del gen BnHMT, que codifica una enzima metiltransferasa específica de H3K9, durante la embriogénesis del polen.

d. Análisis del patrón de expresión temporal del gen BnHAT, que codifica la enzima acetiltransferasa de las histonas H3 y H4 durante la embriogénesis del polen.

2. Dinámica y patrones de localización de auxina endógena y su implicación en la inducción y progresión de la embriogénesis de polen en *Brassica napus*.

a. Cuantificación de la concentración de IAA endógeno en las principales etapas de la embriogénesis de polen.

b. Localización *in situ* de IAA endógeno y sus cambios durante el inicio y progresión de la embriogénesis de polen.

c. Análisis del patrón de expresión temporal del gen BnNIT2, que codifica una enzima nitrilasa de la ruta biosintética natural de auxina de Brassicaceas.

d. Determinación de los efectos del PCIB, droga inhibidora de la señal de IAA, sobre el desarrollo embriogénico.

e. Determinación de los efectos del NPA, droga inhibidora del transporte polar de IAA, sobre el desarrollo embriogénico y la distribución de auxina.

3. Análisis comparativo de dos rutas de embriogénesis *in vitro*, a partir de microsporas y de embrión cigótico inmaduro, en *Quercus suber*.

a. Establecimiento en el laboratorio de Biotecnología del Polen de Plantas Cultivadas del CIB de los dos sistemas de embriogénesis, cultivo *in vitro* de anteras y de embriones cigóticos inmaduros, para la obtención de embriones en *Quercus suber*.

- b. Identificación de marcadores tempranos comunes a los dos sistemas de embriogénesis *in vitro*, de microsporas y de embrión cigótico.
- c. Determinación del nivel y patrón nuclear de metilación global del DNA durante la embriogénesis en ambos sistemas.
- d. Análisis de la distribución de auxina endógena, durante el inicio y progresión de la embriogénesis en los dos sistemas.
- e. Análisis de los niveles de pectinas esterificadas y no esterificadas de la pared celular y su distribución durante el inicio y progresión de la embriogénesis en los dos sistemas.

## OBJECTIVES

1. Characterization of histone epigenetic marks profiles and associated enzymes during pollen embryogenesis induction in *Brassica napus*.

a. *In situ* localization of dimethylated histone H3K9me2 during initiation and progression of pollen embryogenesis.

b. *In situ* localization of acetylated histones H4Ac and H3Ac during initiation and progression of pollen embryogenesis.

c. Analysis of temporal expression pattern of BnHMT gene encoding a specific methyltransferase enzyme of H3K9 during pollen embryogenesis.

d. Analysis of temporal expression pattern of BnHAT, gene encoding an acetyltransferase enzyme of histones H3 and H4 during pollen embryogenesis.

2. Dynamics and localization patterns of endogenous auxin and its involvement in the induction and progression of pollen embryogenesis in *Brassica napus*.

a. Quantification of endogenous IAA concentration in the main stages of pollen embryogenesis.

b. *In situ* localization of endogenous IAA and its changes during the onset and progression of pollen embryogenesis.

c. Analysis of temporal expression pattern of BnNIT2 gene encoding a nitrilase enzyme of the auxin biosynthetic pathway of Brassicaceae.

d. Determination of the effects of PCIB, inhibitor of the IAA signal, on embryogenic development.

e. Determination of the effects of NPA, inhibitor of the IAA polar transport, on embryogenic development and on the distribution of auxin.

3. Comparative analysis of two routes of *in vitro* embryogenesis, from microspores and immature zygotic embryos, in *Quercus suber*.

a. Establishment of the two embryogenesis systems, *in vitro* anther and immature zygotic embryos cultures at the Pollen Biotechnology of Crop Plants laboratory in CIB for obtaining embryos in *Quercus suber*.

- b. Identification of early markers common to both *in vitro* embryogenesis systems, embryogenesis of microspore and zygotic embryo.
- c. Determination of the level and nuclear pattern of global DNA methylation during embryogenesis in the two systems.
- d. Analysis of the distribution of endogenous auxin in the initiation and progression of embryogenesis in the two systems.
- e. Analysis of the levels and distribution of esterified and non-esterified pectins of the cell wall during the initiation and progression of embryogenesis in the two systems.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. MATERIAL BIOLÓGICO**

### **1.a. Yemas florales de *Brassica napus* L.**

Se sembraron semillas de *Brassica napus* cv. Topas en tiestos de 20cm de diámetro con una mezcla de tierra: vermiculita (3:1) en una cámara de crecimiento con una temperatura de 18°C, un fotoperiodo luz/oscuridad 16:8 y una humedad del 80%. Cuando las plantas alcanzaron un tamaño de unos 20 cm de altura, a las 3 semanas, se transfirieron al invernadero con unas condiciones de temperatura y fotoperiodo semejantes. Cuando las horas de luz fueron menores de las deseadas (en el periodo invernal) se suplementaron con luz artificial. Se dejaron crecer hasta el momento en el que empezaron a florecer. La primera floración fue desechada, se cortaron las yemas florales inmaduras, debido a la irregularidad de las flores en los botones florales, y por lo tanto de las distintas etapas del polen dentro de la antera, cuando la planta volvió a florecer se recogieron todos los botones florales y se hizo una selección de aquellas yemas florales que presentaban un tamaño comprendido entre 3,3 mm y 3,6 mm, ya que se ha comprobado previamente que este es el tamaño en el que se encuentra mayor número de microsporas vacuoladas, fase que mejor responde a la inducción de embriogénesis, en la antera.

Con una de las yemas florales se hace un aplastado de anteras sobre un portaobjetos, y se realiza una tinción con 4'6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) para comprobar en el microscopio de fluorescencia (Zeiss 68105), la fase en la que se encuentran las microsporas dentro de la antera. El resto de yemas florales del mismo tamaño son usadas para realizar el cultivo *in vitro* de microsporas.

### **1.b. Anteras y embriones cigóticos inmaduros de *Quercus suber* L.**

En el caso del alcornoque, se recogió material de campo que se recolectó mediante el uso de una pértiga de poda para cortar ramas altas de árboles de *Quercus suber* L. procedentes del arboreto de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de la Universidad Politécnica de Madrid, así como de árboles adultos procedentes del bosque situado en la localidad de El Pardo, Madrid.

Se recogieron dos tipos de material. El primer material fueron amentos masculinos (rametes de anteras), que presentaban un color amarillo/rojizo, de unos 2 cm de largo con flores de 2 mm y anteras de 1,2 mm, entre los meses de abril-junio, dependiendo de la climatología estacional. Estos amentos, como ya ha descrito Bueno et al. 2005, contienen las microsporas vacuoladas, fase que mejor responde a la inducción de embriogénesis, mediante el cultivo de anteras.



El segundo material fue de origen embrionario para el establecimiento de la embriogénesis somática. Se recogieron bellotas inmaduras de color verde, entre los meses de septiembre-octubre, de las que se obtienen los embriones cigóticos inmaduros.

A las ramas recogidas se les aplicó un algodón húmedo en el lugar de corte para prevenir la deshidratación del material, estas ramas fueron embolsadas y se llevaron al laboratorio para continuar con la preparación del material.

La comprobación del estado del desarrollo de las microsporas se realizó mediante un aplastado de la antera sobre un portaobjetos incubándola durante 30 minutos con DAPI 1 µg/ml en PBS añadiéndole Tritón X-100 al 1% para facilitar la penetración del DAPI.

A las ramas con los amentos a las que se han quitado las hojas de manera manual se les aplicó un apósito húmedo por el lugar de corte con la rama y se guardaron a 4°C durante una semana.



**Figura 5:** A: yemas florales de *Brassica napus*; B: amentos de *Quercus suber*; C: bellotas inmaduras de *Quercus suber*. Barras: 5 mm. El asterisco marca la etapa seleccionada.

## 2. CULTIVO *IN VITRO* DE MICROSPORAS, ANTERAS Y EMBRIONES INMADUROS PARA INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS.

### 2.a. Cultivo *in vitro* de microsporas de *Brassica napus* L.

#### 2.a.1 Preparación del medio de cultivo

El medio empleado para el aislamiento, inducción y para el posterior cultivo fue el denominado NLN-13 (Lichter 1982), el cual entre otras características, contiene una elevada cantidad de sacarosa (13 g/L) que hace que no sea necesario refrescar el medio de cultivo durante el proceso de la embriogénesis *in vitro* (unos 25-30 días).

Este medio se preparó a partir de preparados comerciales que consistían en una mezcla de sales basales de NLN, vitaminas de NLN (Duchefa), sacarosa (Merck) y nitrato de calcio (Merck) que se diluyeron en agua Mili-Q.

Para preparar un litro de medio se utilizaron las cantidades que se detallan a continuación:

Sacarosa	130 g
Basal Salt Mixture NLN	0.39 g
Vitamin Mixture NLN	1.04 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.5 g
pH	6

**Tabla 1:** Composición del medio de cultivo de *Brassica napus*

Los componentes se mezclaron en un vaso de precipitado con agua Mili-Q, se disolvieron mediante el uso de un agitador magnético y una vez disueltos se procedió a ajustar el pH mediante la adición de unas gotas de hidróxido sódico 1M (Panreac). Se enrasó hasta 1 L y se procedió a realizar la esterilización por filtración con las unidades de filtración “Sterifil Aseptic System and Holder” (Milipore) mediante la aplicación de una bomba de vacío a la unidad de filtración. El medio se transfirió a una botella estéril y se guardó a 4°C hasta el momento de su uso.

### 2.a.2 Cultivo de microsporas aisladas

Para realizar el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Brassica napus* todo el material utilizado fue previamente esterilizado y todo el proceso se realizó en la campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.

Las yemas florales seleccionadas (3,3-3,6 mm de longitud), contienen la mayor cantidad de microsporas vacuoladas, fase del desarrollo gametofítico más susceptible a la inducción a embriogénesis.

Las yemas florales se recogieron de las plantas cortándolas con tijera y se pusieron en hielo, para su mejor conservación. Después en el laboratorio se realizó la selección por tamaño mediante el uso de un calibre. Una vez seleccionadas se colocaron en un colador de té que se introdujo en un vaso con una disolución de hipoclorito sódico al 2% en agua durante 20 minutos para esterilizar superficialmente las yemas. El vaso se situó sobre un agitador magnético para mantener una

agitación constante y favorecer así la esterilización superficial y los lavados posteriores. Pasado ese tiempo se desechó la disolución de esterilización y se cambió por agua destilada estéril, previamente enfriada a 4°C para ralentizar los procesos de degradación celular, estos lavados se realizaron 4 veces durante 10 minutos cada uno.

Transcurrido ese tiempo las yemas florales se transfirieron a un mortero de cerámica estéril pre-enfriado a -20°C donde se procedió a homogeneizar las yemas florales con 3-5ml de medio NLN-13 para romper la antera y extraer así las microsporas. Este homogeneizado obtenido se filtró a través de un malla de Nylon con un tamaño de poro de 50  $\mu\text{m}$ , acoplada a un embudo, que solo permite el paso de las microsporas, este embudo se colocó sobre un tubo Falcon estéril de 15 ml para recoger el filtrado que en adelante se colocó en hielo para evitar que comenzaran los procesos de degradación celular.

Una vez filtrado todo el homogeneizado se enrasó con medio de cultivo NLN-13 hasta un volumen de 15 ml y se centrifugó suavemente en una centrifuga basculante Eppendorf 5702RH a 1.100 rpm durante 3 minutos a 4°C para aislar las microsporas vacuoladas que se depositan en forma de precipitado en el fondo del tubo. Después de la centrifugación se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado que contiene las microsporas con medio NLN-13 hasta un volumen de 15 ml para lavar el precipitado de restos celulares que interferirían con el proceso de embriogénesis, y se centrifugó de igual manera que para el aislamiento de las microsporas mencionado anteriormente, este proceso de lavado se repitió 3 veces descartando el sobrenadante y resuspendiendo en medio NLN-13.

Para realizar el cálculo y ajuste de la densidad de las microsporas en el medio de cultivo se resuspendió el precipitado obtenido tras el último lavado en 10 ml de medio de cultivo y se tomaron dos muestras de 10  $\mu\text{l}$  que se depositaron en una cámara de Neubauer, donde bajo la observación al microscopio óptico se contaron las microsporas vacuoladas en cada cuadrante, y tras obtener el promedio se calculó, según las recomendaciones del fabricante, el volumen final en el que se debe resuspender el cultivo para obtener una densidad de  $10^4$  microsporas/ $\mu\text{l}$ .

Una vez resuspendido el precipitado de microsporas en el volumen final de medio de cultivo, se distribuyó la suspensión en placas poniendo 15 ml por placa Petri Falcon estériles de 10 cm de diámetro que se cerraron con parafilm y se etiquetaron debidamente.

Las placas obtenidas se apilaron y se envolvieron en papel de aluminio para proteger las placas de la luz y se colocaron en una estufa a 32°C, que es el tratamiento de estrés inductor de embriogénesis.

Desde ese momento se observó el desarrollo de los cultivos cada 2-3 días mediante la observación bajo la lupa binocular (Eliza Tokyo), y se determinaron las etapas para la toma de muestras.

Las placas se mantuvieron a esa temperatura hasta que bajo la observación de la lupa binocular se distinguieron los primeros embriones globulares, 15-20 días, que se pasaron a una cámara a 25°C con agitación orbital constante, a 60 rpm en un agitador (Elmi SkyLine).

#### 2.a.3. Tratamientos con NPA (*N*-1-Naphthylphthalamidic acid) y PCIB (p chlorophenoxyisobutyric acid) en cultivos de microsporas de *Brassica napus*

El NPA es un compuesto que bloquea el transporte polar de auxinas entre células, mientras que el PCIB es un inhibidor de la acción de la auxina.

El NPA (Duchefa) se disolvió en DMSO a una concentración de 100 µM, de esta dilución stock se tomó la cantidad necesaria para añadirla a cada placa de cultivo dependiendo de la concentración deseada: 10 µM o 40 µM, en todos los tratamientos se reservaron algunas placas como control para analizar el proceso de embriogénesis en ambos casos.

El PCIB se disolvió en etanol puro (Merck) a una concentración de 100 µM, de este stock se añadió al medio la cantidad correspondiente para obtener una concentración final de: 5 µM, 10 µM o 20 µM, al igual que en el caso anterior también se reservaron algunas placas como control para observar el proceso de embriogénesis en condiciones normales.

Los tratamientos se realizaron desde el inicio de los cultivos y se llevó a cabo el mismo procedimiento que los cultivos normales, las placas se envolvieron en papel de aluminio para protegerlas de la luz y se pusieron en una estufa a 32°C, tratamiento de estrés inductor de la embriogénesis. Cuando se observaron los primeros embriones globulares se pasaron a una cámara a 25°C con agitación orbital constante a 60 rpm en un agitador (Elmi SkyLine).

#### 2.a.4. Seguimiento del cultivo y recogida de muestras

Cuando bajo la lupa binocular se observaron en el desarrollo de los cultivos en las placas las estructuras de las principales etapas del desarrollo de la embriogénesis del polen a los días señalados. A continuación se recogieron muestras para posteriores estudios de biología celular y molecular.

Tiempo de cultivo	Fase de desarrollo
0 días	Microspora vacuolada
3-4 días	Embriones multicelulares con exina
8-10 días	Embrión globular
14-16 días	Embrión globular y corazón
20-22 días	Embrión torpedo
28 días	Embrión cotiledonar

**Tabla 2:** Tiempos de recogida de muestras del cultivo líquido de microsporas de *Brassica napus*

El número de placas de cultivo que se recogieron en cada etapa dependió de las necesidades experimentales en cada caso; las primeras fases de desarrollo requieren un mayor número de placas para los análisis ya que el tamaño de los embriones en relación con la densidad del cultivo es menor que en fases más avanzadas en la que el tamaño de los embriones es mayor por lo que no se requieren un número tan elevado de placas.

Las muestras en etapas tempranas se tomaron recogiendo todo el contenido de las placas en tubos y posteriormente se centrifugaron.

El contenido de las placas Petri se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugaron en una centrifuga basculante a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C, después de la centrifugación se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet, que contiene las microsporas y los embriones multicelulares, en un volumen de 1-1,5 ml y se transfirió a un tubo eppendorf. Estos tubos fueron después procesados de manera diferente para estudios de biología celular y biología molecular.

Las muestras destinadas a estudios de biología celular se centrifugaron a una baja velocidad, a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C, para preservar la estructura celular y evitar que se dañaran las microsporas y los embriones, que se fijaron inmediatamente.

Los estudios de biología molecular, en cambio, no requieren que se preserve la estructura celular y sí exigen retirar la mayor cantidad de medio de cultivo que puede interferir en posteriores procesamiento, por lo que se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos en una centrifuga

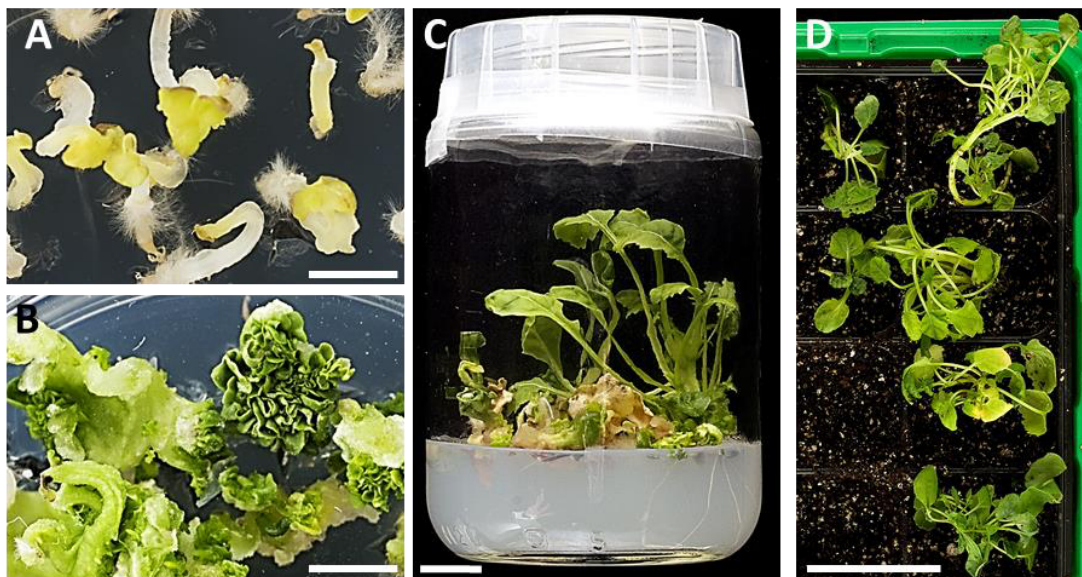
Eppendorf MiniSpin, tras la que se descartó el sobrenadante y se procedió a congelar el tubo de manera rápida sumergiéndolo en un baño de nitrógeno líquido. Posteriormente fueron almacenadas a -80 °C para su mejor preservación.

Las muestras en etapas avanzadas (globulares, torpedo y cotiledonares) se recogieron mediante decantación de los embriones ya que el tamaño y el peso de estos es suficiente para que se depositen en el fondo de un tubo.

Las placas con el medio en el que se encuentran los embriones globulares, corazón, torpedo y cotiledonar se transfirieron a un tubo Falcon de 50 ml que se dejó en hielo durante 10-30 minutos para favorecer que los embriones se depositaran en el fondo del tubo. Después se retiró el medio y se transfirieron los embriones a tubos eppendorf, de los que se retiró el exceso de medio con la ayuda de una micropipeta y se procedió a congelar parte de las muestras en nitrógeno líquido (para estudios de biología molecular) y a fijar el resto de muestras (para estudios de biología celular).

#### 2.a.5. Germinación de embriones y regeneración de plántulas

Para comprobar la viabilidad de los embriones haploides se seleccionaron algunos de los embriones derivados de microsporas que se pusieron a germinar siguiendo el protocolo descrito por Prem et al (2008).



**Figura 6:** Embriones haploides regenerados de *Brassica napus*. **A:** embriones germinando; **B:** Embriones tras la activación de la clorofila; **C:** Planulas *in vitro*; **D:** aclimatación de las plántulas *ex vitro*. Barras: A, B y C: 1 cm; D: 5 cm.

Para llevar a cabo la germinación de embriones y la regeneración de plántulas se seleccionaron algunos embriones cotiledonares que presentaban un eje radicular bien desarrollado y unos cotiledones grandes y redondeados.

El proceso de germinación y regeneración debe hacerse, al igual que el resto del cultivo, en condiciones estériles ya que las características de los medios de cultivo son muy propicias para el crecimiento de hongos y bacterias patógenas que afectan a la viabilidad de los embriones.

Los embriones se recogieron de la placa de cultivo con la ayuda de unas pinzas y se pusieron sobre un papel Wathman estéril dentro de una placa petri de 10 cm. Tras lavar los embriones con agua destilada estéril se dejaron secar al aire dentro de la campana de flujo laminar. Tras lo cual se colocaron sobre una placa con medio MS con sacarosa al 2% y agar bacteriológico 7 g/l, previamente esterilizado y repartido en placas petri Falcon de 10 cm.

Estas placas se dejaron germinar a 18°C en condiciones de oscuridad lo que promueve la activación de la radícula y el cotiledón. Después de un mes en estas condiciones y tras observar el correcto desarrollo de la radícula se transfirieron a una cámara de cultivo a 25°C con un fotoperiodo de 16 h. Pasada una semana se activó la clorofila y después de 3 semanas se observó el desarrollo de plántulas con 3-4 hojas. Estas plántulas fueron transferidas a un semillero con tierra estéril y altas condiciones de humedad para promover su correcto desarrollo.

## **2.b. Cultivo *in vitro* de anteras y embriones cigóticos inmaduros de *Quercus suber* L.**

Tanto la composición del medio de cultivo como las condiciones *in vitro* en las que se desarrolla la embriogénesis son propicias para la aparición de contaminaciones en forma de hongos y bacterias. Ya que el material vegetal procede de lugares no controlados en cuanto a plagas y enfermedades se refiere.

Debido a estas frecuentes contaminaciones hay que realizar, sobre el material vegetal recogido, un proceso intensivo de asepsia. Así como trabajar siempre en condiciones estériles en la campana de flujo laminar y con el material esterilizado previamente.

### **2.b.1. Preparación del medio de cultivo**

Para facilitar la preparación de los medios de crecimiento para el cultivo y debido a que presentan una gran cantidad de componentes comunes se agruparon en soluciones concentradas que se mezclaron y diluyeron en el momento de su utilización.

Los distintos componentes se agruparon en Macronutrientes de Sommer, Vitaminas MS y Micronutrientes MS (SIGMA) (Tabla 3)

Se preparó el medio añadiendo los componentes en el volumen necesario en un matraz, posteriormente se añadió el agar y el carbón activo, en los casos que lo requirieron, tras lo que se ajustó el pH con Hidróxido sódico (NaOH 1 M) y se completó hasta el volumen final del medio, posteriormente se esterilizó mediante autoclave y una vez atemperado se añadieron los compuestos termolábiles, previamente esterilizados por filtración mediante el uso de una jeringuilla y un filtro estéril de 20  $\mu\text{m}$  tamaño de poro.

El medio de cultivo esterilizado fue dosificado en placas Petri Falcon de 10 cm o en un recipiente adecuado, botes de 10 cm en el caso del medio de germinación de embriones haploides y somáticos.

#### 2 b.2. Cultivo de anteras para la embriogénesis de polen

Después de la semana de estratificación se esterizaron únicamente los amentos seleccionados, colocándolos en un Erlenmeyer adaptado para vacío, en que se añade Etanol 70% durante 30-60 segundos en los que se somete a vacío mediante una bomba para facilitar la entrada del alcohol y mejorar las condiciones de esterilización. Después se retira el etanol y con la ayuda de unas pinzas se introducen los amentos en un colador de té que se sumerge en una disolución de hipoclorito sódico al 2% suplementado con Tween-20 al 1% durante 20 minutos en un agitador orbital que mantiene un movimiento constante para favorecer la esterilización de los amentos. Posteriormente se retira el hipoclorito y se realizan 3 lavados con agua destilada estéril a 4°C durante 10 minutos cada uno.

Una vez realizada la esterilización superficial de los amentos se recoge un amento con la ayuda de unas pinzas estériles y sobre una placa Petri estéril se extraen las anteras que se disponen sobre el medio de inducción de embriones haploides.



Medio de inducción de embriogénesis de polen	Medio de inducción de embriogénesis somática	Medio de proliferación de embriones somáticos	Medio de maduración de embriones de polen	Medio de maduración de embriones somáticos	Medio de germinación de embriones de polen y somáticos
Carbón Activo 10 g/l	2,4-D 0,5 mg/l	Glutamina 0,5 mg/l	Carbón Activo 10 g/l	Carbón Activo 10 g/l	BA 0,05 g/l
	Glutamina 0,5 mg/l		Glutamina 0,5 mg/l		AIB 0,1 mg/l
Sacarosa 30 g/l	Sacarosa 30 g/l	Sacarosa 30 g/l	Sacarosa 30 g/l	Sacarosa 30 g/l	Sacarosa 15 g/l
Agar 8 g/l	Agar 8 g/l	Agar 8 g/l	Agar 8 g/l	Agar 8 g/l	Agar 10 g/l
pH 5,6	pH 5,6	pH 5,6	pH 5,6	pH 5,6	pH 5,6
Macronutrientes de Sommer					
Micronutrientes de MS					
Vitaminas de MS					

Macronutrientes de Sommer		
Componente	Stock	Vol. de Stock en 1L de medio
KNO <sub>3</sub>	100 g/l	10 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	12,95 g/l	10 ml
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	25 g/l	10 ml
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	20 g/l	10 ml
KCl	30 g/l	10 ml
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	15 g/l	10 ml

Micronutrientes de MS		
Componentes	Stock	Vol. de Stock en 1L de medio
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2,78 g/l	10 ml
Na <sub>2</sub> EDTA	3,75 g/l	10 ml
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	0,62 g/l	10 ml
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1,69 g/l	10 ml
SO <sub>4</sub> Zn7H <sub>2</sub> O	0,86 g/l	10 ml
KI	0,083 g/l	10 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,025 g/l	10 ml
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,0625 g/l	10 ml
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,6025 g/l	10 ml

Vitaminas MS		
Componentes	Stock	Vol. de Stock en 1L de medio
Glicina	0,2 g/l	10 ml
Inositol	10 g/l	10 ml
Ac. Nicotínico	0,5 g/l	10 ml
Piridoxina HCL	0,5 g/l	10 ml
Tiamina HCL	0,1 g/l	10 ml
Ac. Ascórbico	0,2 g/l	10 ml

**Tabla 3:** Composición de los medios de cultivo de *Quercus suber*

### 2.b.3. Inducción y proliferación de embriones de polen.

La inducción de embriogénesis en las anteras de *Quercus suber* se realiza mediante la aplicación de un estrés por temperatura, tras el que se consigue que las microsporas vacuoladas, fase más susceptible a la reprogramación a embriogénesis, se diferencien en embriones.

Las placas de medio de inducción en las que se encuentran las anteras se someten a un estrés por temperatura en una estufa a 32 °C durante 5 días, tratamiento que hace que las microsporas se reprogramen a embriogénesis.

Pasado ese tiempo se llevan a una cámara de crecimiento a 25 °C en oscuridad, en el que se realiza un repicado mensual. Pasados 20 días se observan estructuras globulares de color blanco rompiendo la pared de la antera que se desarrollarán a estructuras embrionarias como embriones corazón, torpedo y cotiledonar, pudiendo también desarrollarse un callo embriogénico del que se desarrollan las diferentes estructuras embrionarias.

Otros embriones pueden aparecer más tarde, incluso meses más tarde, teniendo el medio que ser renovado cada mes para mantener el material embrionario fresco.

### 2.b.4. Seguimiento del cultivo y recogida de muestras de embriogénesis de polen.

La evolución de las placas con las anteras de *Quercus suber* se realizó mediante la observación bajo la lupa binocular en la que se buscaron las principales etapas del desarrollo de la embriogénesis del polen de las que se tomaron muestras para estudios de biología celular y molecular.

Las muestras fueron recogidas en condiciones estériles en la campana de flujo laminar mediante el uso de unas pinzas y una cuchilla con la que se separaron los distintos embriones de la masa embriogénica principal.

Las muestras de las anteras fueron tomadas antes y después de la puesta en cultivo así como también cada 7 días después de la inducción para localizar los pro-embriones y los embriones globulares que aún no han salido de la antera.

Los embriones globulares, corazón, torpedo y cotiledonares, ya que su tamaño y su localización son demasiado grandes para desarrollarse dentro de la antera, fueron recogidos mediante su separación de la masa embriogénica principal con la ayuda de una cuchilla.

El material seleccionado fue destinado tanto para estudios de biología celular en las que se añadió un fijador estructural, como para biología molecular para lo que se congelaron las muestras

rápidamente en nitrógeno líquido, estas muestras fueron almacenadas a -80°C para preservar las características moleculares.

#### 2.b.5. Cultivo de embriones cigóticos inmaduros para embriogénesis somática.

De las bellotas inmaduras recogidas se eliminó la cúpula y parte del tejido somático con la ayuda de una cuchilla con cuidado de no dañar el embrión.

Estas bellotas se ponen en un colador de té y se introducen en un bote que se sitúa en un agitador magnético y en el que se esterilizan mediante un baño con alcohol al 70% durante 30-60 segundos, tras lo cual se descarta el alcohol y se añade una disolución de hipoclorito sódico al 2% suplementado con Tween-20 al 1% que se mantiene durante 20 minutos.

Posteriormente se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con agua destilada estéril a 4°C.

Con la ayuda de unas pinzas se seleccionó una bellota y con un bisturí se extrae el embrión sin dañarlo, ya que en otro caso perdería viabilidad.

Los embriones extraídos se disponen sobre una placa Petri con medio de inducción de embriones somáticos, que se cierra con parafilm y se etiqueta debidamente.

#### 2.b.6. Inducción y proliferación de embriones somáticos.

La inducción de embriogénesis somática en los embriones cigóticos de *Quercus suber* se consigue mediante la adición de reguladores de crecimiento en el medio de inducción, 0.5 mg/l de 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético), y el aminoácido Glutamina a 0.5 mg/l en el medio de proliferación de embriones somáticos.

Las placas en las que se encuentran los embriones cigóticos extraídos se incuban a 25°C durante un mes en condiciones de luz/oscuridad 16/8. Durante este tiempo algunas células del embrión cigótico se reprograman a embriogénesis y se diferencian a pro embriones y embriones globulares, que se observan bajo la lupa binocular en la superficie del embrión cigótico como unos pequeños puntos de color blanquecino-amarillento.

Pasado ese tiempo los embriones se transfieren a placas Petri con medio de cultivo de proliferación, el cual contiene glutamina, para fomentar la multiplicación de los embriones y de las masas embriogénicas.

En este medio algunas células cigóticas se continúan reprogramando, y los embriones se continúan diferenciando a embriones corazón, torpedo y cotiledonar, mientras que hay otros embriones que forman una masa embriogénica en el que después se diferencian otros embriones.

Una vez en este medio se cambian los embriones y las masas embriogénicas a medio fresco una vez al mes. Durante todo este periodo las placas se mantienen en la cámara de crecimiento a 25°C con ciclos de luz/oscuridad 16/8.

#### 2.b.7. Seguimiento del cultivo y recogida de muestras de embriogénesis somática.

Los embriones cigóticos inmaduros de *Quercus suber* se observaron bajo la lupa binocular en la que se buscaban, en la superficie de los mismos, la presencia de señales que indicaran que se estaba produciendo una reprogramación a embriogénesis. Esto es, la aparición de pequeños puntos blanco-amarillentos en los que se encuentran los pro-embryones y en los que más tarde se desarrollan los embriones globulares. Más adelante, en el medio de proliferación de embriones somáticos, se desarrollan otras etapas del desarrollo de la embriogénesis somática, de los que se tomaron muestras para estudios de biología celular y molecular.

Las muestras se recogieron en condiciones estériles, para preservar la asepsia del resto de embriones cigóticos, en la campana de flujo laminar y mediante el uso de unas pinzas y una cuchilla con la que separaron las partes de interés del embrión cigótico, mientras que las partes que no se habían reprogramado todavía se pasaron a medio fresco.

Los embriones de mayor tamaño, globulares, corazón, torpedo y cotiledonar se separaron tanto del embrión como del callo embriogénico con la ayuda de las pinzas y una cuchilla en aquellos casos que lo requirieron.

El material que se recogió fue destinado tanto para estudios de biología celular en las que las muestras se sumergieron en un fijador estructural, como para biología molecular en la que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su uso.

#### 2.b.8 Maduración y germinación de embriones de polen y somáticos.

Se realizaron experimentos de maduración y germinación de embriones de polen y somáticos sobre embriones cotiledonares de ambos tipos de cultivo.

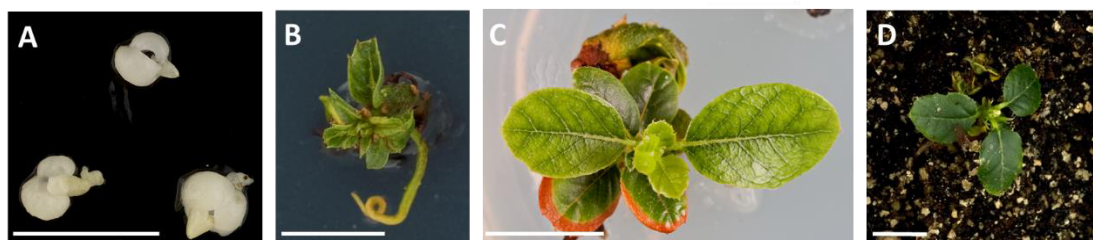
Estos embriones cotiledonares fueron seleccionados por su aspecto. Se seleccionaron aquellos que presentaron unos cotiledones bien desarrollados, simétricos y un eje embrionario igualmente bien

desarrollado, se optó por aquellos que presentaban un tamaño de unos 5-7 mm. Se extrajeron en condiciones de esterilidad y se pasaron a placas con medio de maduración, que se estratificaron durante 2 meses a 4°C protegidos de la luz.

Posteriormente los embriones cotiledonares se transfirieron a placas con medio de germinación que se dejan crecer en una cámara de cultivo a 25°C con unas condiciones de luz/oscuridad 16/8, para de este modo inducir la autonomía del embrión.

#### 2. b.9 Regeneración y aclimatación de plántulas.

Cuando estos embriones, tanto los embriones de polen como los somáticos, presentaban unos cotiledones verdes y una radícula desarrollada, se transfirieron a recipientes con medio de germinación pero con mayor volumen, con cuidado y procurando no dañar la raíz, esto ayuda al embrión a desarrollarse como plántula autónoma. Durante este periodo el embrión desarrolla las primeras hojas y un sistema radicular más complejo, en el que crece más la raíz principal y aparecen pequeñas raíces laterales.



**Figura 7:** Regeneración de plántulas de alcornoque. **A:** embriones haploides cotiledonares maduros; **B:** germinación de embrión haploide; **C:** plántula haploide regenerada *in vitro*; **D:** plántula aclimatada *ex vitro*; Barras: A, B, C y D: 1 cm.

Las plántulas, se extrajeron de los botes de cultivo con la ayuda de unas pinzas y separando el medio gelificado con cuidado de no dañar la raíz, y se colocaron sobre una placa Petri estéril. Se lavó la raíz con agua destilada estéril para eliminar todo rastro de medio de cultivo adherido y se transfirieron entonces a semilleros con tapa transparente, con tierra/vermiculita 3/1 estéril, en condiciones de alta humedad, a 25°C y con unas condiciones de luz/oscuridad 16/8, que favorece el enraizamiento de la planta y el crecimiento de la parte aérea.

Durante las semanas siguientes se fue disminuyendo progresivamente la humedad relativa del semillero para endurecer las plantas.

### **3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPÍA**

#### **3.a. Fijación**

##### 3.a.1. Fijación en paraformaldehído al 4%

Para preservar la estructura celular de las muestras es necesario realizar una fijación de las mismas que permita su manipulación para poder observar su estructura interna así como la preservación del contenido bioquímico, contra el que posteriormente se realizaran ensayos inmunocitoquímicos.

La fijación de las muestras se realizó sumergiéndolas en una solución de paraformaldehído en polvo al 4%(p/v) (Merck) en tampón fosfato salino (PBS) (Fosfato-K 20mM, pH 7.3, NaCl 150mM).

Las muestras sumergidas en la solución de paraformaldehído al 4% se sometieron a vacío introduciéndolas en un desecador conectado a una bomba de vacío, que facilita la penetración del fijador. Una vez fijadas las muestras se guardaron a 4°C durante 18h.

Pasado ese tiempo las muestras se lavaron 3 veces con PBS durante 10 minutos para eliminar el fijador y se cambió esta solución por paraformaldehído al 0.1% (p/v) en PBS para evitar que revierta la fijación. En esta solución pueden ser almacenadas durante semanas.

##### 3.a.2. Inclusión en gelatina

Las muestras que provienen de células aisladas o que por su tamaño y características presentan un manejo difícil se incluyeron en gelatina al 15% (p/v) en PBS para así facilitar su manejo en los sucesivos pasos.

Las muestras previamente fijadas se centrifugaron a 3000rpm durante 5 min a 4°C en una centrifuga basculante Eppendorf 5702RH, tras lo que se descartó el sobrenadante, y seguidamente el pellet se resuspendió en un volumen de 150 µl de gelatina al 15%, que se calentó en un baño a 37°C para aumentar su fluidez y poder así hacer el resuspendido.

Posteriormente se centrifugaron en una centrifuga basculante Eppendorf a 3000rpm a 37° durante 10 minutos e inmediatamente se dejaron enfriar en hielo hasta que solidificó. Para el almacenaje de las muestras se añadieron 50 µl de PBS, para evitar que se seque la gelatina y 50 µl de paraformaldehído al 4% para endurecerla.

Las muestras se guardaron a 4°C durante toda la noche, pasado ese tiempo se desmoldó la gelatina y se eliminó la gelatina sobrante de la muestra. Esta se troceó en pequeñas partes que se almacenaron en paraformaldehído al 0.1% en PBS a 4°C.

### **3.b. Inclusión en resina Technovit 8100 y obtención de cortes semifinos.**

Para procesar las muestras en la resina se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante para incluir las muestras en bloques de los que posteriormente se obtuvieron cortes semifinos sobre los que se realizaron ensayos y tinciones citoquímicas así como inmunocitoquímicas.

#### **3.b.1. Deshidratación**

Las muestras se lavaron tres veces durante 5 minutos con PBS, y seguidamente se incubaron con series de acetona del siguiente modo: 30% 1h x1, 50% 1h x1, 70% o/n x1, 90% 1h x1, 100% 1h x3.

Las soluciones de acetona se realizaron en PBS (v/v). Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C siendo las últimas etapas llevadas a cabo a la misma temperatura pero en agitación constante, en un agitador rotacional.

#### **3.b.2. Infiltración**

Las muestras deshidratadas se infiltraron en Technovit 8100, resina que es de naturaleza hidrofílica por lo que resulta muy útil para estudios generales de microscopía óptica.

La solución de infiltración se preparó a partir de 10 ml de la solución “Base-Liquid Historresin plus” en los que se disolvió 0.06 g del producto “activador” en un recipiente de vidrio, tal como viene detallado en el kit.

Se retiró de las muestras la acetona 100% y se cambió por la solución de infiltración, en la que se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante.

Las muestras que presentaban problemas de infiltración, ya sea por presentar un gran tamaño o por proceder de tejido muy maduro, se incubaron durante dos días a 4°C en agitación constante, cambiando la solución de infiltración entre un día y otro.

#### **3.b.3. Polimerización**

Una vez que las muestras se han infiltrado se realiza un cambio de la solución de infiltración.

La solución de inclusión se preparó en el momento de usarla en un recipiente de vidrio protegido de la luz, ya que de otro modo polimeriza, se preparó a partir de 3 ml de solución de infiltración y 0.16 ml de la solución “Hardener II”, tal como viene detallado en las instrucciones del kit.

Se colocaron las capsulas de gelatina (Agar Scientific), del tamaño adecuado para la muestra, en una gradilla y esta sobre un transiluminador.

En cada capsula se depositó una gota de la solución de inclusión que hace que la muestra sea más fácilmente orientable y se evita de este modo la formación de burbujas. En cada capsula se introdujo una muestra con la ayuda de un palillo de madera y se llenó con solución de inclusión, se taparon las capsulas y se dejó polimerizar la resina durante toda la noche a 4°C protegido de la luz.

#### 3.b.4. Obtención de cortes semifinos en ultramicrotomo.

Para realizar un estudio estructural de las muestras se obtuvieron cortes semifinos de las mismas en un ultramicrotomo (LKB Ultratome III), con la ayuda de una cuchilla de vidrio.

Las cuchillas de vidrio (Taab Superglass) se obtuvieron a mano en un equipo “knifemaker” (LKB Bromma), a partir de barras de vidrio.

Los bloques que contienen las muestras se situaron en el cabezal del ultramicrotomo que se ajustó al brazo móvil de la máquina, el cual se enfrentó a la cuchilla de vidrio sobre la que se depositan los cortes de 1-2  $\mu\text{m}$ .

Una vez que mediante el sucesivo corte del bloque se alcanza la muestra o la región de interés se recogieron los cortes, con la ayuda de unas pinzas, que se situaron sobre una gota de agua en un portaobjetos.

Dependiendo de si los cortes se utilizaron para técnicas citoquímicas o inmunocitoquímicas se secaron utilizando una placa calefactora o al aire respectivamente.

#### **3.c. Recubrimiento de portaobjetos con APTES**

Para llevar a cabo los estudios de inmunocitoquímica se usaron cortes semifinos que se depositaron sobre un portaobjetos multipocillo, lavados con un detergente neutro y agua destilada. Una vez secos y resguardados del polvo en todo momento, se recubrieron según el protocolo de Rentrop et al. 1986.



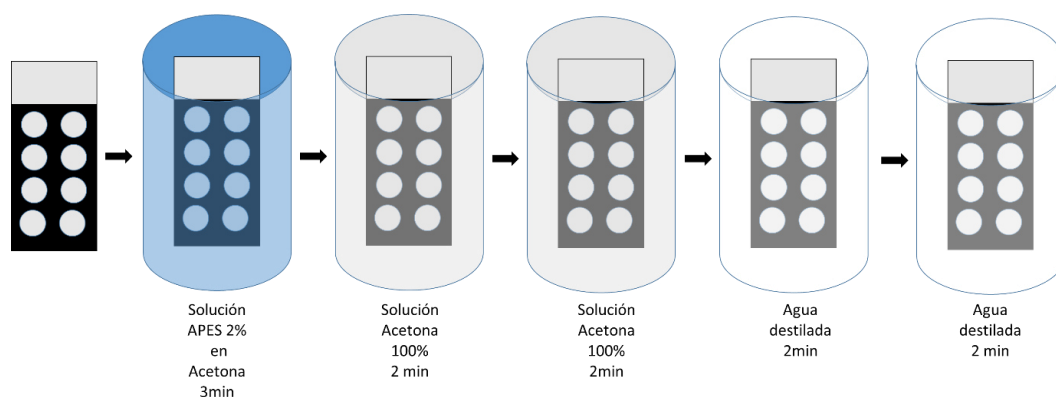


Figura 8: Esquema del proceso de recubrimiento de los portaobjetos multipocillo con APTES

El proceso de recubrimiento se realizó sumergiendo los portaobjetos en una solución recién preparada al 2% (v/v) en Acetona pura (Merck) de 3-amino-propil-trietoxi-xilano (APTES) (Sigma) durante 3 minutos. A continuación se sumergieron en dos sucesivas jarras coplin con acetona pura (Merck) durante 2 min, y posteriormente en dos de agua destilada durante 2 minutos, después se dejaron secar al aire protegidos del polvo y se guardaron en cajas hasta el momento de su uso.

### 3.d. Obtención de cortes en criostato

#### 3.d.1 Crioprotección con sacarosa

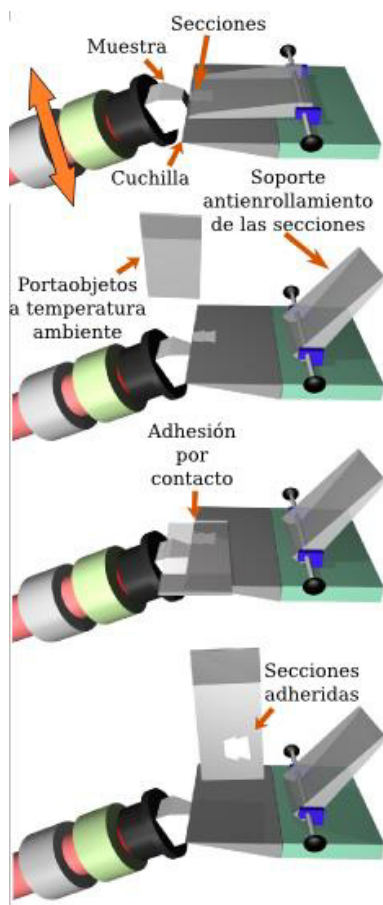
Para poder llevar a cabo los criocortes se hace necesario crioproteger las muestras para que el agua intracelular no cristalice rompiendo las células. Con la crioprotección se consigue que el agua no cristalice sino que vitrifique, de modo que no daña a las células y permite el endurecimiento de la muestra por congelación lo que favorece el corte.

Las muestras fijadas previamente en paraformaldehído al 4% se lavaron 3 veces de 10 minutos cada una con PBS, después se procedió a su incubación con soluciones de sacarosa en concentraciones crecientes (0.1M, 0.5M, 1M, 1.5M, 2M, 2.3M) siendo estas incubaciones de una hora cada una, excepto la última incubación que se llevó a cabo o/n, y las tres últimas incubaciones en agitación constante para facilitar la penetración de la sacarosa; en las muestras más grades o complejas se repitió la última incubación cambiando la solución de sacarosa por una nueva.

#### 3.d.2 Obtención de criocortes en criostato

Las muestras crioprotegidas en sacarosa se cortaron en secciones de 20 a 50  $\mu\text{m}$  en un criostato Leica.

Las muestras debidamente crioprotegidas se incluyeron en bloques de OCT (Optimal Cutting Temperature) que solidifica a 0°C. Y que se dispuso en moldes adecuados para cada tipo de material que permitieran orientar la muestra encastrada en el gel, este proceso se realizó sobre nieve carbónica que facilita la rápida solidificación del gel pero que permite orientar la muestra antes de su completa polimerización.



**Figura 9:** Esquema de funcionamiento de un criostato y recogida de muestras (Figura adaptada de “Atlas de Histología Vegetal y Animal” Universidad de Vigo).

Estos bloques son almacenados a -20°C hasta el momento de su uso.

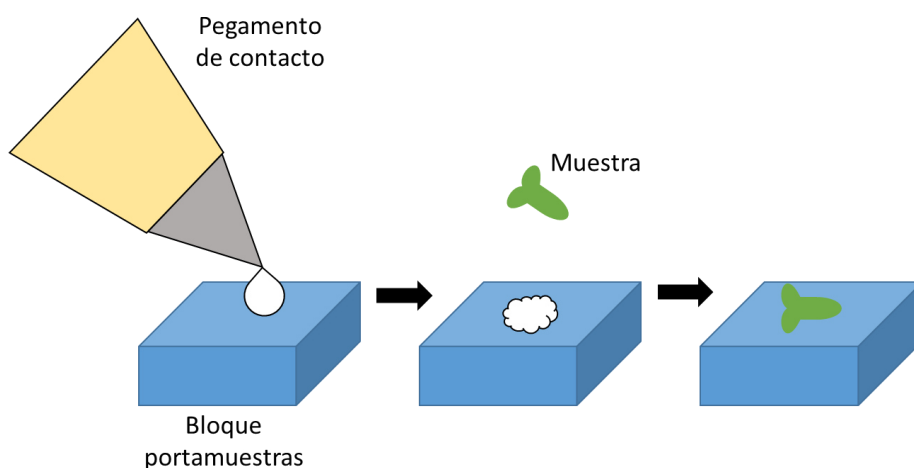
El criostato permite que el proceso de corte se realice a -20°C. La muestra se adhirió al cabezal del aparato mediante unas gotas de gel OCT, este se colocó en el brazo del criostato y tras colocar la cuchilla y seleccionar el espesor de corte deseado se procedió al corte de la muestra. Las secciones obtenidas se recogen mediante adherencia por contacto con un portaobjetos. El gel OCT fue eliminado del portaobjetos con agua y los cortes fueron recogidos con la ayuda de un pincel y colocados sobre una gota de agua en un portaobjetos multipocillo previamente recubierto. Los

cortes obtenidos se dejaron secar al aire protegidos del polvo y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante al menos una noche para favorecer la permeabilización del corte y conservarlo hasta su utilización.

### 3.e. Obtención de cortes en vibratomo

A partir de muestras fijadas en paraformaldehído al 4% se obtuvieron cortes de  $50\mu\text{m}$  de grosor en el equipo Vibratomo1000 (Formely Lancer).

La muestra se fijó en el bloque portamuestras mediante pegamento de contacto, que se situó en la cavidad correspondiente. Se comprobó que no se moviera para que el corte fuera preciso.

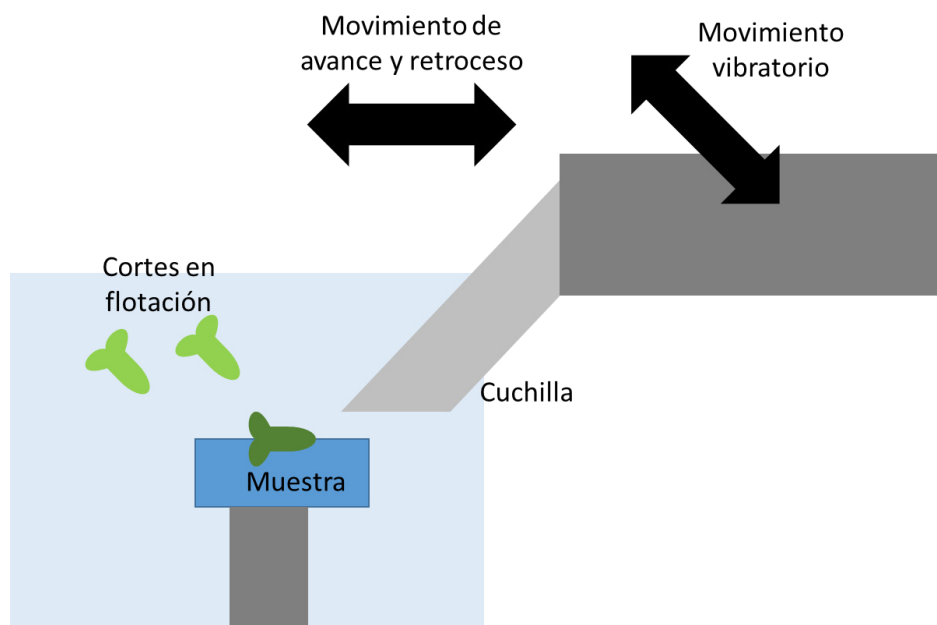


**Figura 10:** Esquema de la fijación de la muestra al bloque portamuestras de un vibratomo.

Después se llenó el compartimento con agua destilada hasta que el bloque y la muestra quedaron sumergidas en el agua.

Se seleccionó la velocidad deseada y el nivel de vibración de la cuchilla, se ajustó el grosor del corte y se procedió al avance de la cuchilla que seccionó la muestra dejando el corte obtenido en flotación.

Este se recogió con la ayuda de un pincel y se situó en un portaobjetos multipocillo previamente recubierto.



**Figura 11:** Esquema del funcionamiento de un vibratomo y la obtención de cortes

Los cortes se dejaron secar al aire protegidos del polvo y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , lo cual además ayuda a la permeabilización de la muestra, hasta el momento de su uso.

### **3.f. Tinciones y citoquímicas.**

Se tiñeron y se realizaron diferentes inmunocitoquímicas sobre los cortes semifinos de Historesin Plus para estudiar la morfología y características específicas de cada muestra.

#### **3.f.1. Tinción con azul de toluidina**

Se preparó una solución de Azul de Toluidina al 1% (p/v) en agua destilada que fue filtrada antes de su uso.

Los cortes semifinos de Historesin Plus se tiñeron con la solución de azul toluidina poniendo una gota sobre cada uno de los cortes durante 5 minutos, después se realizaron varios lavados con agua destilada y se dejaron secar al aire resguardados del polvo.

Cuando los cortes estuvieron completamente secos se procedió a su montaje de forma permanente con Eukitt (Kindler GmbH & Co) y se observó en un microscopio óptico en campo claro.

### 3.f.2. Citoquímica para Almidón

Para la detección del almidón se utilizó la citoquímica del yodo/yoduro potásico ( $I_2KI$ ). El fundamento de esta tinción es que el yodo se acopla dentro de la molécula de almidón. El color que presente el granulo de almidón depende de su tamaño siendo más oscuro cuando es grande y siendo más claro tornando a rojizo si es pequeño.

Se preparó la tinción mezclando 2 g de KI y 0.2 g de I que se disolvieron en 100 ml de agua destilada, esta solución fue filtrada antes de su uso.

Los cortes obtenidos se tiñeron poniendo una gota de esta solución sobre cada uno de ellos durante 10-15 min, después se realizaron varios lavados con agua destilada y se dejaron secar al aire protegidos del polvo.

Finalmente cuando los cortes estuvieron completamente secos se procedió a su montaje de forma permanente con Eukitt (Kindler GmbH & Co) y se observó en un microscopio óptico en campo claro.

### 3.f.3 Citoquímica con DAPI

Se preparó una solución stock 10ug/ml en agua destilada a partir del producto comercial 4'6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Serva) y se almacenó a 4°C. La solución de trabajo se preparó a partir de la solución Stock a una concentración final de 1ug/ml en agua destilada y Tritón X-100 al 1% (v/v), para facilitar la penetración del DAPI en el tejido.

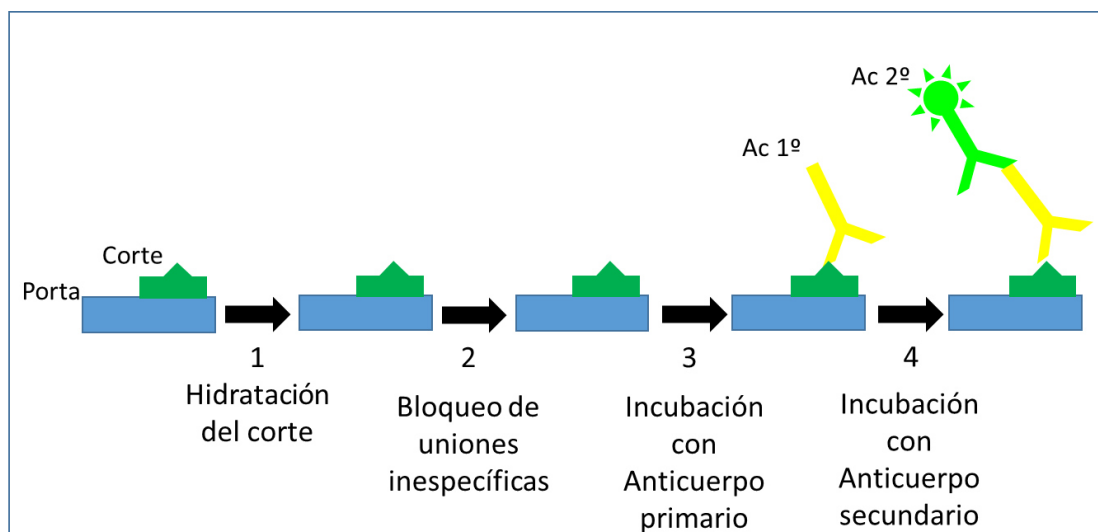
El DAPI es un colorante fluorescente que tiñe específicamente el DNA, de manera que permite la visualización de los núcleos.

Los cortes obtenidos se incubaron en oscuridad durante 5 minutos con una gota de la solución de trabajo. Pasado ese tiempo se dejaron secar y se procedió a montar las muestras de manera semipermanente con un medio de montaje miscible en agua, "Mowiol 4-88" (Sigma) y se observaron bajo una luz ultravioleta en un microscopio óptico de fluorescencia.

## **4. INMUNOFLUORESCENCIA**

Las secciones obtenidas mediante los diferentes métodos de corte explicados anteriormente, fueron depositados sobre portaobjetos multipocillo previamente recubiertos con APTES para favorecer que los cortes se adhirieran al portaobjetos durante todo el proceso.

El protocolo general que se llevó a cabo es como se detalla a continuación: hidratación del corte, bloqueo de uniones inespecíficas, incubación con el anticuerpo primario, bloqueo secundario, incubación con el anticuerpo secundario específico, incubación con DAPI, lavados y montaje.



**Figura 12:** Esquema de la reacción de inmunofluorescencia

A este protocolo se le introdujeron modificaciones dependiendo del tipo de material, del tipo de sección del material y de la especificidad del anticuerpo tal y como se verá a continuación.

Los anticuerpos primarios usados se detallan en la siguiente tabla:

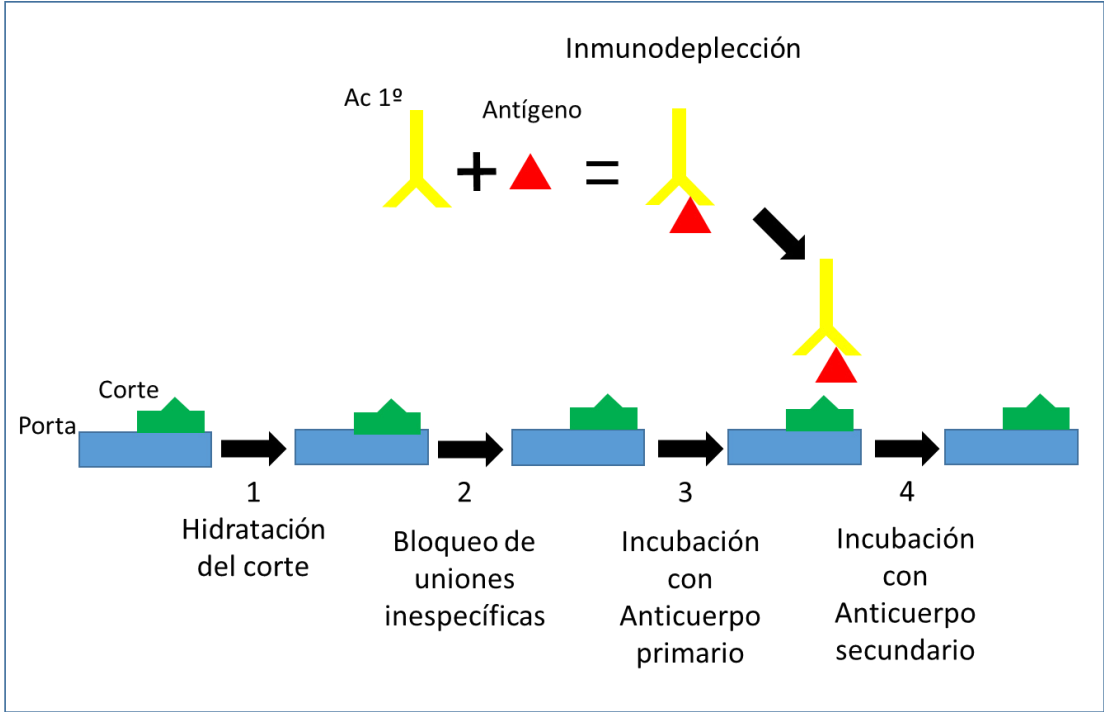
Anticuerpo	Origen	Características inmunológicas	Antígeno	Dilución	Compañía (Nº de catálogo)
Anti-IAA	Ratón	Monoclonal	Auxina	1:100	Sigma: A0855
JIM5	Rata	Monoclonal	Pectinas esterificadas	1:25	PlantProbes: JIM5
JIM7	Rata	Monoclonal	Pectinas no esterificadas	1:25	PlantProbes: JIM7
Anti-H3Ac	Conejo	Policlonal	Histona H3 Acetilada	1:25	Molecular Probes: A16634
Anti-H4Ac	Conejo	Policlonal	Histona H4 Acetilada	1:25	Molecular Porbes: A16719
Anti-5mdC	Ratón	Monoclonal	5mdC	1:50	Eurogentec: BI-MECY-0100

**Tabla 4:** Condiciones de los anticuerpos primarios.

Para cada uno de los anticuerpos detallados se realizaron los controles negativos necesarios, siendo sustituido el anticuerpo por agua durante la incubación con el anticuerpo primario y siguiendo el protocolo de manera normal, comprobando posteriormente la señal en el microscopio laser confocal.

Ensayo de inmunodeplección

En el caso del anticuerpo Anti-IAA, se llevó a cabo un control por inmunodeplección, es decir, el anticuerpo se incubó con su antígeno de modo que queda bloqueado, pero es usado posteriormente para realizar el ensayo de inmunofluorescencia, de tal modo que es imposible que se una al antígeno de la muestra, con lo que se comprueba la especificidad del anticuerpo por su antígeno.



**Figura 13:** Esquema de la reacción de inmunodeplección

Los anticuerpos secundarios de fluorescencia fueron los que se detallan a continuación:

Anticuerpo	Dilución	Tiempo	Compañía
Alexa 488 Anti-ratón	1:25	1h	Molecular Probes
Alexa 488 Anti-rata	1:25	1h	Molecular Probes
Alexa 488 Anti-conejo	1:25	1h	Molecular Probes

**Tabla 5:** Condiciones de los anticuerpos fluorescentes secundarios

#### 4.a. Inmunofluorescencia sobre cortes de Technovit 8100

PBS		5 min	Debido a que la resina usada es una resina de tipo hidrofílica, se requiere en primer lugar hidratar el corte por lo que se aplican unas gotas de PBS y que se cambian varias veces.
PBS		5 min	
PBS		5 min	
BSA	5%	10 min	Después se aplica el bloqueante de uniones inespecíficas, que fue BSA al 5%, FCS al 10% o BSA-C dependiendo de la reactividad del anticuerpo usado en cada momento. Tras dejarlo incubando con el corte durante 10 minutos se procedió a la incubación con el anticuerpo primario. Esta se realizó en una cámara húmeda, dentro de una placa Petri, para evitar que no se secase el anticuerpo en el pocillo del portaobjetos debido a que los cortes se incuban con 10 µl de la dilución del anticuerpo durante 1 hora.
Anticuerpo primario		1h	
BSA	1%	10 min	
Anticuerpo secundario		45 min	Posteriormente se realiza un bloqueo más ligero de las uniones específicas, durante 10 minutos, ya que en esta ocasión solo se requiere que el anticuerpo secundario se une a los anticuerpos primarios ya unidos al epítipo de interés.
PBS		5 min	
PBS		5 min	
PBS		5 min	El anticuerpo secundario se preparó en el momento y en oscuridad y se aplicó sobre los cortes de igual modo que el primario dejándolo incubar durante 45 minutos, además de en este punto en los sucesivos, se puso el portaobjetos en oscuridad para que el fluoróforo acoplado al anticuerpo secundario no se degrade. Pasado ese tiempo se realizaron sucesivos lavados con PBS y se aplicaron sobre los cortes 10 µl de DAPI, un colorante fluorescente de ácidos nucleicos, que se incubó durante 10 min. Y después de realizar varios lavados de los cortes se procedió al montaje con Mowiol, y se selló al cubreobjetos con laca.
DAPI		10 min	
PBS		5 min	
PBS		5 min	
PBS		5 min	



#### 4.b. Inmunofluorescencia sobre cortes de vibratomo y criostato

Metanol	30%	5 min
Metanol	50%	5 min
Metanol	70%	5 min
Metanol	100%	5 min
Metanol	70%	5 min
Metanol	50%	5 min
Metanol	30%	5 min
Coctel enzimático		45 min
PBS		5 min
PBS		5 min
PBS		5 min
BSA	5%	10 min
Anticuerpo primario		1h
BSA	1%	10 min
Anticuerpo secundario		45 min
PBS		5 min
PBS		5 min
PBS		5 min
DAPI		10 min
PBS	x 3	5 min

Como se ha visto anteriormente el grosor de las secciones obtenidas por estas técnicas, vibratomo y criostato, es de entre 20-50  $\mu\text{m}$  por lo que requieren un proceso de permeabilización para facilitar la penetración del anticuerpo hasta su antígeno celular.

Este proceso de permeabilización se llevó a cabo mediante tres acciones consecutivas. Primero las secciones obtenidas se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para que en el proceso de congelación los cristales de hielo que se forman rompan parcialmente la pared celular, en segundo lugar se llevó a cabo un proceso de deshidratación-rehidratación con diluciones de metanol, y en último lugar se sometió a los cortes a un tratamiento con un cocktail de enzimas de digestión de pared celular (Rybaczek et al. 2006). Posteriormente se realizaron varios lavados con PBS y se procedió de igual manera que con los cortes de Technovit 8100 como ya se ha explicado en el punto anterior.

## **5. TÉCNICAS DE “INMUNO-BLOT”**

### **5.a. Preparación de muestras para la extracción.**

Para este tipo de ensayo las muestras que se recogieron se congelaron en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su uso.

### **5.b. Extracción de proteínas**

#### 5.b.1 Preparación del tampón de homogenización

Se preparó una solución stock de tampón de homogenización 5x (100 mM Tris pH 8.0, 10% SDS (p/v), 5%  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v), 1 mM PMSF). Esta solución se almacenó a temperatura ambiente para evitar la precipitación del SDS. En el momento de uso se diluyó con agua estéril y se añadió la cantidad correspondiente de inhibidores de proteasas, PMSF.

#### 5.b.2 Extracción de proteínas totales.

En todos los casos se partió de 25 mg de material previamente congelado y almacenado a -80°C. Las muestras se homogenizaron con la ayuda de un mortero de porcelana, previamente pre-enfriado, y añadiendo constantemente nitrógeno líquido para evitar que la muestra se descongelase y comenzaran los procesos de degradación. El machado se realizó hasta que la muestra quedo totalmente pulverizada.

Al polvo obtenido se le fue añadiendo progresivamente tampón de homogenización hasta la saturación de la muestra.

La muestra, en forma de pasta espesa, se transfirió a un tubo de 1,5 ml (Eppendorf) y se hirvió durante 3 min a 95°C con la tapa ligeramente abierta o agujereada. Pasado ese tiempo se dejó enfriar progresivamente a temperatura ambiente durante 30 min y seguidamente se centrifugó en una centrifuga de mesa (Eppendorf MiniSpin) a 10.000 rpm durante 15 min. El sobrenadante es el extracto crudo de proteínas, que se almacenó a -20°C hasta el momento de uso.

#### 5.b.3 Extracción de proteínas nucleares

Para el caso del inmunoblot de histonas se realizó la extracción de proteínas nucleares. Estos experimentos se realizaron durante una estancia en el laboratorio de la Dra. Claudia Khöler, de la SLU, en Uppsala, Suecia.

En cada caso se partió de 100 mg de material previamente congelado y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se homogeneizaron con la ayuda de un mortero de porcelana previamente pre-enfriado y al que se le añade constantemente nitrógeno líquido para evitar la degradación de la muestra, el machacado se realizó hasta que la muestra quedó totalmente pulverizada.

Al polvo obtenido se le añadió 0.5 ml de 0.4 M Ácido sulfúrico y se incubaron durante 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después las muestras fueron centrifugadas a 15000 rpm durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante fue transferido a un tubo de vidrio y el pellet se volvió a resuspender repitiendo el mismo procedimiento, los sobrenadantes fueron combinados en el tubo de vidrio.

Se añadieron 12 ml de acetona y se dejaron precipitar las proteínas toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ , posteriormente fueron centrifugadas a 7000 rpm durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrifuga Sorvall ss-34, se descartó el sobrenadante y el pellet se secó al aire en una campana de extracción. Una vez seco el pellet se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de 4 M urea. Posteriormente se añadió 2x Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% Glicerol, 2% SDS, 0.01% Azul de bromofenol).

### **5.c. Determinación de la concentración de proteínas**

#### **5.c.1 Determinación de la concentración de proteínas mediante el método Bradford**

Para la determinación de la concentración de proteínas totales se utilizó como patrón de calibración albumina de suero bovino (BSA).

Las muestras se prepararon en un volumen final de 1 ml, que estaba formado por 980  $\mu\text{l}$  de la solución de Bio-Rad y 20  $\mu\text{l}$  de la muestra o una dilución de la misma. La mezcla se deja estabilizar durante 5 min y se procedió a su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm frente a un blanco preparado con el tampón de homogenización empleado.

#### **5.c.2 Determinación de la concentración de proteínas totales mediante Qubit.**

En el caso del inmunoblot de histonas se realizó la extracción de proteínas nucleares. Estos experimentos se realizaron durante una estancia en el laboratorio de la Dra. Claudia Khöler, de la SLU, en Uppsala, Suecia.

Las muestras de proteínas nucleares fueron previamente hervidas durante 3 min y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

Las proteínas nucleares se cuantificaron usando el Qubit 2.0 Fluorometer assay (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 5.d. Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Para la separación de las proteínas se utilizó un equipo “Mini-Protean III” de Bio-Rad siguiendo básicamente la técnica ya descrita por Laemmli (1970).

Para llevar a cabo la separación se prepararon dos geles, uno de poliacrilamida al 12% (p/v) de 0,75 mm de espesor, y otro gel de poliacrilamida al 4% que funciona como gel concentrador.

	<b>Gel de separación al 12%</b>	<b>Gel de concentración al 4%</b>
Acrilamida al 30%	3.7 ml	0.5 ml
Tampón de separación 4x (Tris-HCl 0.5 M pH 8.8)	2.3 ml	--
Tampón de concentración 4x (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8)	--	1 ml
Glicerol al 50%	0.9 ml	--
SDS al 10%	90 µl	40 µl
Agua destilada	2.1 ml	2.46 ml
Persulfato amónico al 10%	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

**Tabla 5:** Composición de los geles de Poliacrilamida

En la cubeta de electroforesis se colocaron los geles una vez polimerizados. El compartimento interior de la cubeta se llenó con tampón de electroforesis Tris-HCl 0.025 M pH 8.3, con glicina 0.192 M y SDS al 0.1% (p/v), mientras que el compartimento exterior se llenó con el mismo tampón de electroforesis pero sin SDS.

Se sometió la cubeta de electroforesis a un voltaje de 100V constante con una intensidad de corriente siempre en exceso.

Para marcar en los geles la distribución de las proteínas por peso se utilizaron marcadores de masas moleculares de entre 10 y 250 KDa (Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards, Bio-Rad).

Cuando se consideró que las proteínas estaban suficientemente separadas se dejó de aplicar corriente a la cubeta de electroforesis.

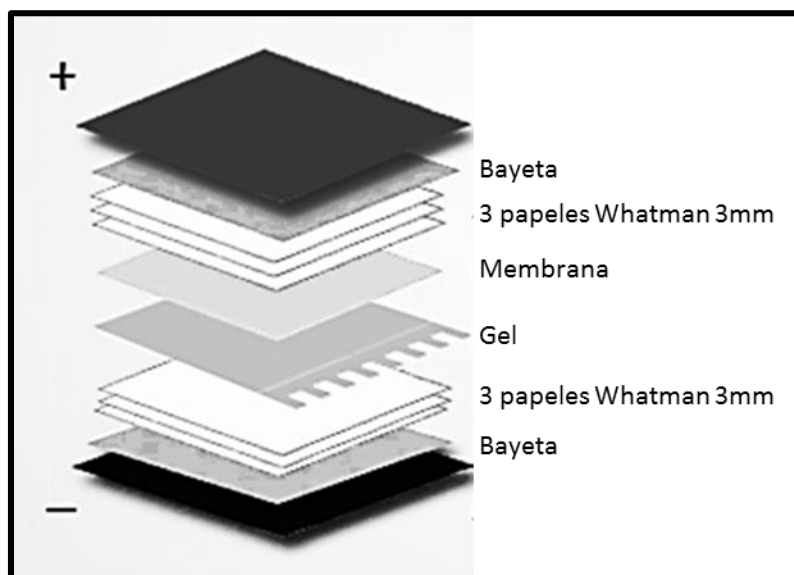
#### 5.e. “Western-Blot” de geles SDS-PAGE

##### 5.e.1 Transferencia de proteínas a la membrana

Los geles en los que se han separado las proteínas son transferidos a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) (Millipore), mediante un sistema de transferencia húmeda “Mini Trans Blot

Cell” de Bio-Rad, empleando como tampón de transferencia Tris-HCl 25 mM, Glicerina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3.

El gel concentrador es eliminado y el gel separador y la membrana se equilibraron y se dispusieron en el orden que se indica en la figura. Este proceso se llevó a cabo manteniendo 350 mA durante 2h, este proceso fue llevado a cabo a 4°C en una cámara fría.



**Figura 14:** Representación esquemática del sistema de transferencia

Para comprobar la eficiencia de la transferencia se realizó una tinción con Rojo Ponceau (Sigma). Mediante esta tinción podemos visualizar las proteínas de la membrana y comprobar en los carriles que se ha producido la transferencia. Esta tinción fue posteriormente eliminada de la membrana con sucesivos lavados de agua desionizada.

#### 5.e.2 Inmunodetección de la proteína

Para poder llevar a cabo una comparación de las distintas etapas se cargó la misma cantidad de proteína en todos los carriles del gel, 2 µg para cada una de las muestras. La membrana fue bloqueada en una solución al 2% de leche en polvo semidesnatada en PBS con 0.1% Tween durante 2h. Después la membrana se incubó con el anticuerpo primario, diluido 1/1000 en la solución de bloqueo, durante 2h. Posteriormente se reveló la membrana usando un anticuerpo secundario fluorescente (IRDye 800CW, IRDye 680RD) (Li-Cor), que se incubaron con las membranas durante 1h.

Se observaron las membranas y se cuantificó la intensidad de las bandas usando el sistema Li-Cor Odyssey y el software Image Studio v2.0.

## **5.f. Técnicas de “Inmuno Dot-Blot”**

### **5. f.1 Preparación y extracción del material**

La obtención de las proteínas se realizó de manera habitual como se ha explicado previamente.

### **5.f.2 Ensayo Dot-Blot**

Las muestras fueron diluidas o concentradas a una concentración de 1 mg/ml, de cada muestra se aplicaron 10 µl en una membrana de nitrocelulosa (Milipore) y se dejó secar durante 1h, a continuación se realizó una tinción de Rojo Ponceau para comprobar que se ha cargado la misma cantidad de cada muestra. Se eliminó el colorante con sucesivos lavados de agua desionizada y se procedió a bloquear la membrana con una solución al 2% de leche en polvo semidesnatada en PBS con 0.1% Tween durante 1h.

A continuación se realizaron tres lavados con TBS de 10 min cada uno y se procedió con la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios, JIM5 y JIM7 en una proporción 1:100 en la solución de bloqueo y se dejó incubando durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación constante suave.

Posteriormente se volvió a lavar la membrana con TBS como se ha descrito y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) en una dilución 1:1000 en solución de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente y agitación constante suave.

A continuación se procedió a equilibrar la membrana con el tampón de detección (Tris-HCl, NaCl 0.1 M, pH 9.5) durante 2 minutos y finalmente se reveló la membrana mediante el producto NBT/BCIP ready-to-use Tablets (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante, finalmente las membranas se dejaron secar y se digitalizaron.

## **6. CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE METILACIÓN GLOBAL DEL DNA GENÓMICO**

### **6.a. Preparación del material vegetal**

Para llevar a cabo la cuantificación de la metilación global del DNA genómico se utilizaron muestras congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C.

### **6.b. Extracción del DNA genómico**

El aislamiento del DNA genómico se llevó a cabo mediante el empleo del Kit DNeasy Plant Minikit (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, del que se requirieron 100 mg de peso fresco, y del que además se realizaron 3 repeticiones técnicas y hasta un 4 replicas biológicas.

### **6.c. Evaluación del DNA genómico**

La concentración del DNA extraído se evaluó mediante espectrofotometría en un Nanodrop (Thermo Scientific, NanoDrop 2000) a partir de 1  $\mu$ l de DNA extraído, asumiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50  $\mu$ g/ml de DNA.

La pureza del DNA se determinó mediante el cociente de las lecturas a 260 y 280 nm, sabiendo que el valor optimo es 1.8 y observando el perfil de la gráfica obtenida del barrido de absorbancia entre 220 y 320 nm, para conocer si hay otros factores que estén interfiriendo, sabiendo que la curva optima presenta un pico a 260 nm con forma de campana.

Las muestras de DNA que cumplían los requisitos minimos de concentración (100 ng/ $\mu$ l), y pureza se usaron para la cuantificación del porcentaje de DNA genómico metilado.

### **6.d. Cuantificación del porcentaje de DNA genómico metilado.**

Para llevar a cabo una correcta cuantificación mediante colorimetría del porcentaje de DNA genómico se requieren un minimo de 100 ng de DNA en cada muestra, tal y como indica el fabricante del Kit MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric) (Epigenetek, NY).

El DNA extraído se pone en cada uno de los pocillos de la placa tipo ELISA proporcionada por el fabricante, haciendo tres replicas de cada una de las muestras, después se procedio a efectuar varios lavados y capturar el DNA metilado con un anticuerpo, y posteriormente se procedió a su detección con el anticuerpo secundario y aumentar la señal de DNA metilado con la solución proporcionada por el fabricante, a continuación se añadió la solución reveladora de color, que es de la que se mide la absorbacia.

La medición de la cuantificación de la colorimetría se realizó de acuerdo a la intensidad de la densidad óptica medida en una placa ELISA a 450 nm, en un Lector de Placas ELISA. En el experimento se incluyeron los correspondientes controles negativos y positivos proporcionados por el fabricante, donde el control positivo contine un 50 % de citosinas metiladas, 5mdC.

Los resultados fueron expresados en porcentaje de las deoxycitosinas metiladas del total de DNA, para cada una de las muestras utilizando la siguiente formula:

$$5mdC = \frac{(DO\ M - DO\ C\ neg) \div S}{(DO\ C\ pos - DO\ C\ neg) \times 2 \div P} \times 100\%$$

**DO M:** densidad óptica de la muestra; **DO C neg:** densidad óptica del control negativo; **DO C pos:** densidad óptica del control positivo; **S:** cantidad en ng de DNA de la muestra; **P:** cantidad en ng de DNA del control positivo.

## 7. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FITOHORMONAS

El conjunto de experimentos de extracción y cuantificación de Fitohormonas fue llevado a cabo durante dos estancias en la Universidad Jaume I de Castellón bajo la supervisión del Prof. D. Aurelio Gómez-Cadenas, mediante la técnica descrita por el grupo en Durgbanshi et al. (2005).

### 7.a. Preparación de la muestras

Las muestras fueron recogidas en las distintas etapas de la embriogénesis y se congelaron de manera rápida sumergiendo el tubo en un baño de nitrógeno líquido. Posteriormente fueron almacenadas a -80°C para preservar todas sus características moleculares.

### 7.b. Extracción de fitohormonas

En tubos de centrifuga de 12 ml se dispuso 100 mg del material, al que se añadieron 25 µl de Estandar Interno y 5 ml de agua destilada, se homogeneizó con ayuda de un homogeneizador de tejidos (Ultra-Turrax, Ika-Werke, Staufen, Germany) durante 1 min a máxima velocidad. Entre muestras el homogeneizador se limpió con un lavado de acetona (Merck) y tres lavados de agua destilada para evitar que se contaminaran las muestras.

Compuesto Stock	Volumen
2d-IAA (5ppm)	100 µl
DHJA (86ppm)	58 µl
SAd (125ppm)	80 µl
ABAd (125ppm)	80 µl

**Tabla 6:** Composicion del Estandar interno



Una vez homogeneizadas las muestras se centrifugaron los tubos a 4000rpm durante 45 min a 4°C en una centrifuga Sorvall SS-34, del que se tomó el sobrenadante, que se acidificó, con ayuda de un pH-metro con una sonda fina, añadiendo ácido acético (Merck) al 30% hasta alcanzar un valor de pH de 3.

Posteriormente se procede a hacer la partición liquido-liquido con dietileter (Panreac), para lo que se añadieron 3ml de dietileter a la muestra acidificada, que se mezcló con la ayuda de un vortex, y a continuación se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos.

Se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo y se volvió a hacer la partición con la fase acuosa remanente, así como la centrifugación de la que también se tomó el sobrenadante que se añadió al obtenido anteriormente.

Esta fase orgánica se desecó en el speed-vac (Jouan, Saint Herblain, France), con un programa que no proporcione calor y que permite la entrada de aire. Una vez secos estos tubos pueden ser almacenados a -20°C durante un máximo de 2 semanas o pueden ser procesados directamente.

### **7.c. Cuantificación de fitohormonas mediante LC/ESI-MSMS**

El pellet obtenido se resuspende en 50 µl de metanol puro (Merck) y se sónica durante 10 min, pasado ese tiempo se añadieron 450 µl de agua MiliQ que se homogeneizaron con el vortex y se pasó por un filtro de acetato de 22 µm de tamaño de poro, asegurándonos después de recoger todo el líquido haciendo pasar aire por el filtro un par de veces.

Esta muestra purificada se puede congelar a -20°C o proceder a separarlas inyectándolas en el UPLCTM Acquity system (Walters, USA). El extracto fue entonces analizado mediante separación en fase reversa en una columna UPLC C18 (Nucelodur C18, 1.8 µm, 50 x 2.0 mm, Macherey), usando metanol y agua suplementada con 0.01% de ácido acético como solventes para un ratio de flujo de 300 µl/min.

El espectrómetro de masas, un “triple quadrupole” (TQD, Micromass) se hizo funcionar en modo electrospray de ionización negativa. Se realizaron 3 replicas técnicas y 3 replicas biológicas para cada punto del estudio.

La concentración final se obtuvo mediante la relación entre la concentración y el peso fresco del que se había partido para cada muestra.

## 8. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-qPCR

### 8. a. Preparación del material vegetal

Para llevar a cabo los estudios de expresión de genes, el material vegetal fue congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C.

### 8.b. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

El RNA se aisló de las diferentes muestras de cultivo en las diferentes etapas analizadas tal como se detalla en Solís et al. 2012. Mediante un Kit de extracción de RNA de Quiagen, RNeasy Micro, para muestras vegetales.

Para llevar a cabo la extracción se procedió de una cantidad de material no superior a 100 mg, que se pulverizó con la ayuda de un moertero pre-enfriado y nitrógeno líquido, procediendo rápidamente a añadir el tampón de extracción y después de varios lavados y centrifugados, se obtuvo un volumen de 50 µl, en el que después de medir su concentración en el NanoDrop se determinó que la cantidad de RNA fuera superior a 30 µg.

Un microgramo de RNA total fue usado para la reacción de RT usando la enzima transcriptasa reversa Superscript TM II (Invitrogen). El cDNA sintetizado se utilizó para llevar a cabo los análisis de expresión de los genes de interés seleccionados.

### 8.c. Selección de oligonucleótidos

Para el análisis de la expresión del gen de la Histona Acetil transferasa (HAT), los oligonucleótidos usados fueron: 5' AGCCGAGTACACTTGCCCTA 3' y 3' GCCTAGCCCTCTCCTGTCTT 5' procedentes de la secuencia del gen *HAC5* de *Brassica rapa* (número de accesoión Bra039359 en *Brassica* gene database <http://brassicadb.org>), homólogo del gen *HAC5* de *Arabidopsis* el cual codifica una histone acetyltransferasa que puede usar las hitonas H3 y H4 como sustratos (Earley et al. 2007). Para el analisis de la expresión del gen de la metriltransferasa en lisina de histonas (HKMT) los oligonucleótidos usados fueron: 5' TTGTTGCGTGAGCTGTAAGG 3' y 3'GGGCAGTCTTGGCAGTAAAA 5', procedentes de la secuencia del gen *HKMT* de *Brassica rapa* (número de accesoión Bra040197 en *Brassica* gene database <http://brassicadb.org>), homologo al gen metiltransferasa en lisinas de histonas de *Arabidopsis*, *SUVR4* (Thorstensen et al. 2006). Asi mismo para llevar a cabo el analisis de la expresión del gen de la nitrilasa (NIT2), los oligonucleótidos usados fueron : 5' TGCCAGTTCTGCAAGCGTAAAG 3' y 3' ATCGTCGTACCAGTCGGTGAAC 5', procedentes de la secuencia del gen NIT2 de *Brassica napus* (AF380304.1) (Ishikawa et al. 2007).

#### **8.d. Condiciones para la qPCR**

El cDNA se amplificó usando la SsoAdvanced™SYBR®Green supermix en el “iQ™5 Real-Time PCR Detection System” (Biorad). Todas las reacciones de qPCR se hicieron por duplicado. Las condiciones del termociclo fueron como sigue: una desnaturalización inicial de 30 s a 95 °C, seguida de 40 ciclos, cada uno de los cuales consistente en 5 s a 95 °C, 30 s a 56°C. Después de cada ciclo se tomó la curva de disociación para comprobar por especificidad de amplificación calentando las muestras desde 65 a 95°C. Se utilizaron diluciones seriadas de cDNA para determinar la eficiencia de la curva de cada par de primers como se detalla en Costa et al. 2013. La  $\beta$ -tubulina (*TUB*) y la Glyceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa 2 (*GAPDH.2*) se usaron como genes de referencia internos. Al final de todos los ciclos de PCR, los datos fueron analizados con el programa Bio-Rad CFX Manager 3.0 (3.0.1224.1015) (Biorad), usando el método de cálculo e Livak (Livak y Schmittgen 2001).

#### **9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos aquellos parámetros que presentan unos valores cuantificables fueron analizados estadísticamente usando el programa MiniTab 16, a través del cual se analizaron los datos usando un análisis de la varianza ANOVA seguido de un Test de Tukey, para la comparación de mas de dos muestras, o mediante una T de Student, para dos muestras, fijando diferencias significativas para  $p \leq 0.05$ . Los resultados obtenidos se representaron en histogramas, en los que se indicó aquellos resultados que fueron estadísticamente significativos.

## RESULTS



**PUBLICACIÓN I:**

**Changes in histone methylation and acetylation during microspore reprogramming to embryogenesis occur concomitantly with BnHKMT and BnHAT expression and are associated to cell totipotency, proliferation and differentiation in *Brassica napus***

Referencia:

**Rodríguez-Sanz, H.**, Moreno-Romero, J., Solís, M.T., Köhler, C., Risueño, M.C., Testillano, P.S. (2014) Changes in histone methylation and acetylation during microspore reprogramming to embryogenesis occur concomitantly with BnHKMT and BnHAT expression and are associated to cell totipotency, proliferation and differentiation in *Brassica napus*. *Cytogenetic and Genome Research* 143(1-3):209-218



## Resumen de la PUBLICACIÓN I:

**Los cambios en la metilación y acetilación de histonas durante la reprogramación a embriogenesis de la microspora ocurren paralelamente con cambios en la expresión de *BnHKMT* y *BnHAT* y están asociados con la totipotencia celular, la proliferación y la diferenciación en *Brassica napus*.**

La microspora vacuolada se reprograma como respuesta al tratamiento de estrés convirtiéndose en una célula totipotente que sigue la ruta embriogénica y produce embriones haploides y doble-haploides, que son una importante herramienta biotecnológica en mejora vegetal para propagación de especies mejoradas. Entre los mecanismos reguladores de este proceso, todavía bastante desconocidos, además del control genético los mecanismos epigenéticos tienen un papel importante. Las marcas epigenéticas son cambios covalentes de la cromatina heredables que no afectan a la secuencia del DNA, entre los más prevalentes se encuentran la metilación del DNA y las modificaciones de histonas. Estudios recientes han revelado la implicación de la metilación del DNA en la regulación del proceso de embriogénesis de polen pero todavía no existen datos de la implicación de las modificaciones de las histonas en el mismo.

Las modificaciones de histonas son una marca epigenética que controla la expresión génica durante el desarrollo en plantas y también como respuesta a los cambios en el ambiente. Así, la modificación mediante la metilación de lisinas es llevada a cabo por las metiltransferasas de lisina de histonas o “histone lysine methyltransferases” (HKMTs), y puede ocurrir en diferentes residuos de lisina, como por ejemplo en la lisina 9 de la histona H3 (H3K9), metilación que se ha relacionado con regiones de silenciamiento transcripcional. Al contrario, la acetilación de las histonas H3 y H4, que es llevada a cabo por acetiltransferasas de histonas o “histone acetyl transferase” (HATs) se ha asociado a genes transcripcionalmente activos.

En este trabajo se analizan tres marcas epigenéticas de histonas, la dimetilación en la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me<sub>2</sub>), la acetilación de la histona H3 (H3Ac) y de la histona H4 (H4Ac) durante distintas etapas del proceso de embriogénesis del polen de *Brassica napus*, mediante ensayos de “Western-Blot” e inmunofluorescencia y análisis en microscopía laser confocal. También se han estudiado los patrones de expresión de los genes de la histona metil transferasa *BnHKMT* y la histona acetiltransferasa *BnHAT* mediante qPCR en las mismas etapas del proceso.

Los resultados indican cambios epigenéticos que afectan a la proporción de H3K9me<sub>2</sub>, H3Ac y H4Ac, en etapas concretas de la embriogénesis del polen, presentando la dimetilación de la histona



H3 un patrón diferente al de la acetilación de las histonas H3 y H4. Los patrones espacio-temporales de distribución de las histonas estudiadas, (H3K9me2, H3Ac y H4Ac), se correlacionan con los perfiles de expresión de los genes *BnHKMT* y *BnHAT* respectivamente. Estos perfiles revelan un aumento específico de expresión de H3K9me2 y *BnHKMT* en etapas avanzadas del proceso lo que sugiere la participación de la H3K9me2 y la enzima KHMT en las modificaciones nucleares y la heterocromatinización que ocurren durante la diferenciación celular del embrión. Por otro lado los patrones de H3Ac, H4Ac y *BnHAT* sugieren que la acetilación de las histonas H3 y H4 y la enzima HAT pueden estar implicadas en la activación transcripcional en la reprogramación de la microspora y en la proliferación celular durante el desarrollo embrionario.

Estos resultados aportan nuevos datos sobre la regulación epigenética mediante modificaciones de histonas de la embriogénesis del polen.

## **Publicación I:**

# **CHANGES IN HISTONE METHYLATION AND ACETYLATION DURING MICROSPORE REPROGRAMMING TO EMBRYOGENESIS OCCUR CONCOMITANTLY WITH *BnHKMT* AND *BnHAT* EXPRESSION AND ARE ASSOCIATED TO CELL TOTIPOTENCY, PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION IN *Brassica napus***

## **ABSTRACT**

In response to stress treatments, microspores can be reprogrammed to become totipotent cells that follow an embryogenic pathway producing haploid and double-haploid embryos, which are important biotechnological tools in plant breeding. Recent studies have revealed the involvement of DNA methylation in regulating this process, but no information is available on the role of histone modifications in microspore embryogenesis. Histone modifications are major epigenetic marks controlling gene expression during plant development and in response to environment. Lysine methylation of histones, accomplished by histone lysine methyltransferases (HKMTs), can occur on different lysine residues, with histone H3K9 methylation being mainly associated with transcriptionally silenced regions. In contrast, histone H3 and H4 acetylation is carried out by histone acetyltransferases (HATs) and is associated with actively transcribed genes.

In this work we analyze three different histone epigenetic marks: dimethylation of H3K9 (H3K9me2) and acetylation of H3 and H4 (H3Ac and H4Ac) during microspore embryogenesis in *Brassica napus*, by Western blot and immunofluorescence assays. The expression patterns of histone methyltransferase *BnHKMT* and histone acetyltransferase *BnHAT* genes have been also analyzed by qPCR. Our results revealed different spatial and temporal distribution patterns for methylated and acetylated histone variants during microspore embryogenesis and their similarity with the expression profiles of *BnHKMT* and *BnHAT*, respectively. The data presented suggest the participation of H3K9me2 and HKMT in embryo cell differentiation and heterochromatinization events, whereas H3Ac, H4Ac and HAT would be involved in transcriptional activation, totipotency and proliferation events during cell reprogramming and embryo development.

## INTRODUCTION

Epigenetic mechanisms are highly dynamic events that modulate gene expression. In plants, they play an important role in development, flowering, pathogen recognition, senescence and somaclonal variation. The structure and function of chromatin are regulated by multiple epigenetic mechanisms, including post-translational covalent histone modifications, small RNAs and DNA methylation (Kouzarides 2007, Leeb and Wutz 2012). Epigenetic marks can be transmitted during cell division and can also be reversed, providing a way to confer plasticity in the plant response to environmental changes and developmental cues (Yaish et al. 2011; Köhler et al. 2012).

Microspore embryogenesis constitutes an intriguing system in which the microspore, at the developmental stage of vacuolated microspore (González-Melendi et al. 1995), is reprogrammed by stress treatments and, as a totipotent cell, redirects its gametophytic program towards an embryogenic pathway. The resulting haploid and double haploid plants are important biotechnological tools in plant breeding (review in Maluszynski et al. 2003; Bárány et al. 2005; 2010a; Prem et al. 2012). Although increasing amounts of information on the presence of genes and molecules controlling microspore stress response were reported in recent years (Rodríguez-Serrano et al. 2012; El-Tantawy et al. 2013), the underlying genetic and epigenetic processes controlling microspore embryogenesis are still poorly understood. Changes of DNA methylation during tapetum programmed cell death (Solís et al. 2014), pollen maturation and microspore embryogenesis (Solís et al. 2012; El-Tantawy et al. 2014), suggest that microspore reprogramming is associated with reconfiguration of the epigenome.

Histone methylation and acetylation play an essential role in diverse biological processes ranging from transcriptional regulation to heterochromatin formation. Lysine methylation of histones decorates both transcriptionally silenced and active chromatin domains, depending on which lysine residues are methylated and the degree of methylation. Generally, H3K4 and H3K36 methylation is associated with active genes, whereas H3K9 and H3K27 methylation is associated with silenced regions (Liu et al. 2010). In *Arabidopsis*, H3K9 methylation was found predominately as H3K9me1 and H3K9me2 in chromatin regions enriched in transposons and repeated sequences and associated with heterochromatin (Lippman et al. 2004). The methylation marks of histones are written by distinct enzymes named histone lysine methyltransferases or HKMTs (Liu et al. 2012a). Acetylation of histone lysines has been recognized as a characteristic of actively transcribed genes by altering histone-DNA interactions and making the DNA more accessible to the transcription machinery (Xu et al. 2005, Earley et al. 2007). N-terminal lysine residues of histones H3 and H4 are found to be acetylation targets for different histone acetyltransferases (HATs), enzymes which

contribute to many plant development and adaptation processes, in combined action with histone deacetylases (Pandey et al. 2002; Xu et al. 2005; Liu et al. 2012b). Changes in chromatin condensation-decondensation states have been reported at different developmental stages during microspore embryogenesis in relation to changes in chromatin function and cell activity (Testillano et al. 2000; Testillano et al. 2005).

In this work the changes of three histone epigenetic marks, H3K9me2, H3Ac and H4Ac were analyzed during microspore embryogenesis in *Brassica napus* by Western blot and immunofluorescence assays. The expression patterns of BnHKMT and BnHAT genes, were analyzed by qPCR. Our results reveal differential spatial and temporal distribution patterns for methylated and acetylated histone variants during microspore embryogenesis. The expression profiles of BnHKMT and BnHAT genes are similar to the distribution patterns of methylated and acetylated histones respectively. Together, our data show that microspore embryogenesis is accompanied by dynamic changes of histone marks H3K9me2, H3Ac and H4Ac.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Plant material and microspore culture**

*Brassica napus* L. cv. Topas donor plants were grown under controlled conditions at 15/10 °C in a 16/8 h light/dark cycle. Isolated microspore culture and embryogenesis induction was performed at 32 °C, as described by Prem et al. (2012).

### **Fixation and processing for immunofluorescence**

Microspore culture samples were collected at different times and fixed overnight with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) at 4°C. Culture samples of the first stages containing isolated microspores and small multicellular pro-embryos were previously embedded in gelatine, dehydrated and resin-embedded at low temperature. Large multicellular, globular and torpedo embryos were processed either for cryostat or resin embedding.

#### ***Processing for cryostat sectioning***

Fixed samples were washed in PBS, and cryoprotected through a gradual infiltration in sucrose solutions: 0.1M, 0.5M, 1 M, 1.5M, 2M for 1h each, and 2.3 M o/n at 4°C, embedded in Tissue-Tek optimal cutting temperature (OCT) compound and frozen on dry ice for sectioning in the cryostat (Leica CM 1950). 20-30 micrometers thick sections were collected on glass slides, washed

with water to eliminate the OCT and transferred to a water drop over 3-aminopropyl-triethoxy-silane (APTES)-coated slides, air-dried and stored at -20°C until use for immunofluorescence (IF).

#### *Processing for resin embedding and ultramicrotome sectioning*

Fixed samples were washed in PBS, dehydrated through an acetone series (30%, 50%, 70%, 90% and 100%) and embedded in Technovit 8100 resin (Kulzer, Germany) at 4°C. The blocks were sectioned at 1-2 µm thickness and stained with 1% toluidine blue, for structural analysis, mounted with Eukitt and observed under bright field microscopy. Some sections were placed on APTES coated slides, air-dried, and stored at 4°C until use for immunofluorescence (IF).

#### **Immunofluorescence**

IF was performed essentially as previously described by us (Testillano et al. 2013). For cryostat sections, permeabilization was required prior to IF. After thawing the sections at room temperature, they were dehydrated and rehydrated in a methanol series (30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 90%, 70%, 50%, 30%, 5min each) and PBS, and subjected to enzymatic digestion of cell walls for additional permeabilization with 2.5% pectinase, 2.5% cellulase and 2.5% pectoliase (Rybaczek et al. 2007) in PBS for 45min. Semithin resin sections did not require permeabilization and were subjected directly to the immunodetection, after incubation in PBS for a few minutes. At this step, all section types followed the same IF protocol.

Sections were first blocked with 10% fetal calf serum (FCS) in PBS 10 min and incubated 1h with anti-H3K9me2 (Diagenode, Cat. No. pAb-060-050), anti-Acetyl-Histone H3 (Millipore, Cat. No. 06-599) or anti-Acetyl-Histone H4 (Millipore, Cat. No. 06-598) rabbit polyclonal antibodies diluted 1:100 in 1% BSA in PBS. After three rinsing steps in PBS, sections were incubated for 45min in darkness with the secondary antibody Alexa Fluor 488-labelled anti-rabbit IgG antibody (Molecular Probes) diluted 1/25 in PBS for 45 min in the dark. Negative controls were performed replacing the primary antibody by PBS. After washing in PBS, nuclei were stained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole), washed with PBS, mounted in Mowiol and examined in a confocal microscope (Leica TCS-SP2-AOBS, Vienna, Austria). Images of maximum projections were obtained with software running in conjunction with the confocal microscope (Leica software LCS version 2.5).

#### **Histone extraction**

The samples, previously frozen in liquid nitrogen, were grinded in a chilled mortar and pestle, 0.1g was used for each sample; 0.5ml of 0.4M sulphuric acid was added to resuspend the powder. After 1h incubation on ice, the samples were centrifuged at 15000 rpm for 5min at 4°C and the

supernatant was transferred to a glass corex tube, the pellet was resuspended a second time repeating the previous step, and the supernatants were combined in the corex tube. 12ml of acetone were added and left at -20°C o/n to precipitate the proteins. The samples were centrifuged at 7000 rpm for 15min at 4°C in a Sorvall ss-34 centrifuge, the supernatant was removed and the pellet was air dried in a fume hood. The pellet was resuspended in 100 µL of 4M urea. 2x Laemmli buffer was added, the proteins were quantified using the Qubit 2.0 Fluorometer assay (Invitrogen). The samples, previously boiled for 3 min, were stored at -20°C.

### **Western blot analysis**

Protein extracts were separated by electrophoresis (110V) in 12% acrylamide SDS gels (Mini-Protean III, BioRad) and then transferred to Immobilon membranes (Millipore Corp) by electroblotting (350mA for 2h). For comparison purposes, equal amounts of proteins (2 µg) were loaded per sample. For immunodetection, the membranes were blocked in a 2% dilution of powdered skimmed milk in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween for 2h. Then, membranes were incubated for 2h with the primary antibody, anti-H3K9me2 (Diagenode, Cat. No. pAb-060-050), anti-Acetyl-Histone H3 (Millipore, Cat. No. 06-599), or anti-Acetyl-Histone H4 (Millipore, Cat. No. 06-598), diluted 1/1000 in the blocking solution. Then the membranes were revealed using fluorescent secondary IRDye® 800CW or IRDye® 680RD antibody (Li-Cor), incubating the antibody for 1h, the membranes were observed and fluorescent band intensities quantified using Li-Cor Odyssey system with the Image Studio v2.0. Two independent biological samples and two replicates of each sample were performed per developmental stage and antibody. Differences among stages were tested by one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test at  $P \leq 0.05$ .

### **Quantitative real-time PCR (qPCR)**

RNA was isolated from the different culture samples at the different stages analysed, according to Solis and coworkers (2012).. One µg of total RNA was used for the RT reaction using the Superscript TM II reverse transcriptase enzyme (Invitrogen). For expression analysis of the *HAT* gene, the oligonucleotides used were: 5' AGCCGAGTACACTTGCCCTA 3' and 3' GCCTAGCCCTCTCCTGTCTT 5' from the sequence of the *HAC5* gene of *Brassica rapa* (Bra039359 accession number in *Brassica* gene database <http://brassicadb.org>), homologous of the *HAC5* gene of *Arabidopsis*, which encodes a histone acetyltransferase that can use both H3 and H4 histones as substrates (Earley et al. 2007). For the expression analysis of *HKMT* gene the oligonucleotides used were: 5' TTGTTGCGTGAGCTGTAAGG 3' and 3'GGGCAGTCTTGGCAGTAAAA 5', from the sequence of the *HKMT* gene of *Brassica rapa*

(Bra040197 accession number in *Brassica* gene database <http://brassicadb.org>), homologous of SUV4H3 Histone Lysine Methyl Transferase gene of *Arabidopsis* (Thorstensen et al. 2006).

cDNA was amplified using the SsoAdvanced™SYBR®Green supermix on the iQ™5 Real-Time PCR Detection System (Biorad). All qPCR reactions were run in duplicates. Thermocycle settings were as follows: initial denaturation of 30 s at 95°C, followed by forty cycles, each consisting of 5 s at 95°C, 30 s at 56°C. After each run, a dissociation curve was acquired to check for amplification specificity by heating the samples from 65 to 95°C. Serial dilutions of cDNA were used to determine the efficiency curve of each primer pair according to (Costa et al. 2013).  $\beta$ -tubulin (*TUB*) and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 (*GAPDH.2*) were used as internal reference genes. At the end of the PCR cycles, the data were analyzed with the Bio-Rad CFX Manager 3.0 (3.0.1224.1015) (Biorad), using the Livak calculation method (Livak and Schmittgen 2001). Two independent reactions with two different biological samples and two replicates of each reaction were performed per developmental stage and gene. Transcript levels were normalized to vacuolated microspore stage levels. Differences among stages were tested by one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test at  $P \leq 0.05$ .

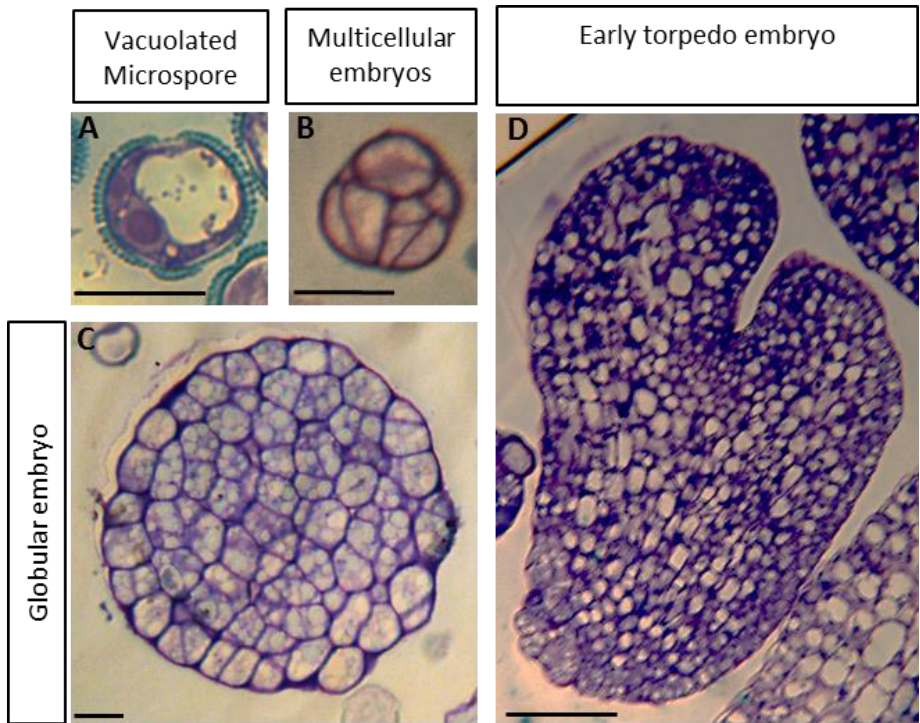
## RESULTS

### **Histone H3K9me2 distribution and BnHKMT expression patterns during microspore embryogenesis**

Microspore embryogenesis was induced in *Brassica napus* by stress treatments of 32°C at the developmental stage of vacuolated microspore (Fig. 1A). The responsive microspores reprogrammed their gametophytic program towards an esporophytic pathway by undergoing cell divisions leading to the formation of multicellular embryos (Fig. 1B). As embryogenesis proceeded, distinct embryo stages could be distinguished: globular (Fig. 1C), torpedo (Fig. 1D) and cotyledonary embryos. After thirty days, mature embryos were able to germinate giving rise to haploid and double-haploid plants (Prem et al. 2012). Three representative developmental stages of microspore embryogenesis were selected to analyse epigenetic histone modifications: vacuolated microspores (collected at culture initiation, before embryogenesis induction), multicellular embryos (early stage after embryogenesis induction) and globular/torpedo embryos (advanced stages of embryogenesis).

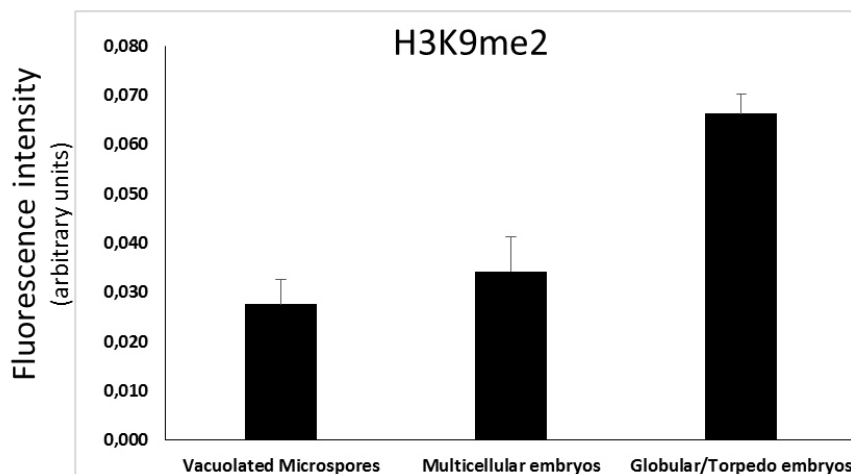
Western blot analysis with specific antibodies against H3K9me2 revealed changes in the level of H3K9me2 during microspore embryogenesis progression (Fig. 2). Before embryogenesis induction, vacuolated microspores showed low H3K9me2 levels. After embryogenesis initiation, multicellular embryos did not show significant differences in H3K9me2 signal intensity, whereas at more advanced developmental stages globular and torpedo embryos showed a highly significant increase of H3K9me2, more than two times the level found in vacuolated microspores and multicellular embryos.

Anti-H3K9me2 immunofluorescence assays were analysed by confocal microscopy using the same laser excitation and sample emission capture settings for image acquisition in all immunofluorescence preparations, allowing an accurate comparison among signals from cells at different developmental stages. This analysis revealed a specific immunofluorescence signal of mid intensity in the nuclei of vacuolated microspores (Fig. 3A, A', A'') and multicellular embryos (Fig. 3B, B', B''); the nuclei were identified by DAPI and showed an homogeneous mid blue fluorescence which reflected a chromatin pattern of low-mid condensation in vacuolated microspores and early embryos, as reported for this plant species and cell types (Seguí-Simarro et al. 2011). No significant

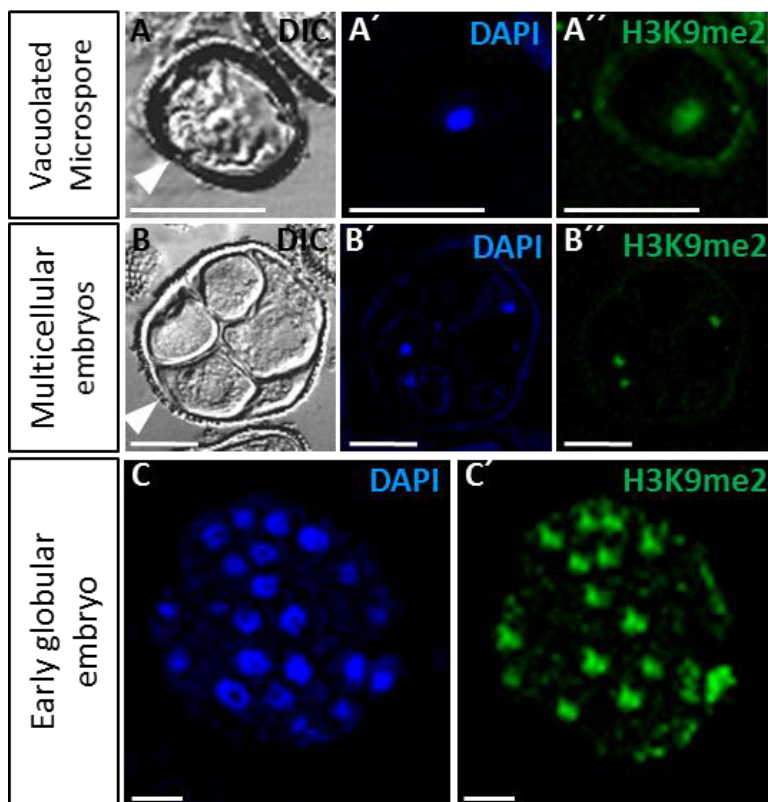


**Figure 1: Main stages of microspore embryogenesis.** Semithin sections, toluidine blue staining. **A:** Vacuolated microspore; **B:** Multicellular embryo; **C:** Globular embryo; **D:** Early torpedo embryo. Bars: in A, B, C, 20 µm; in D, 150 µm.



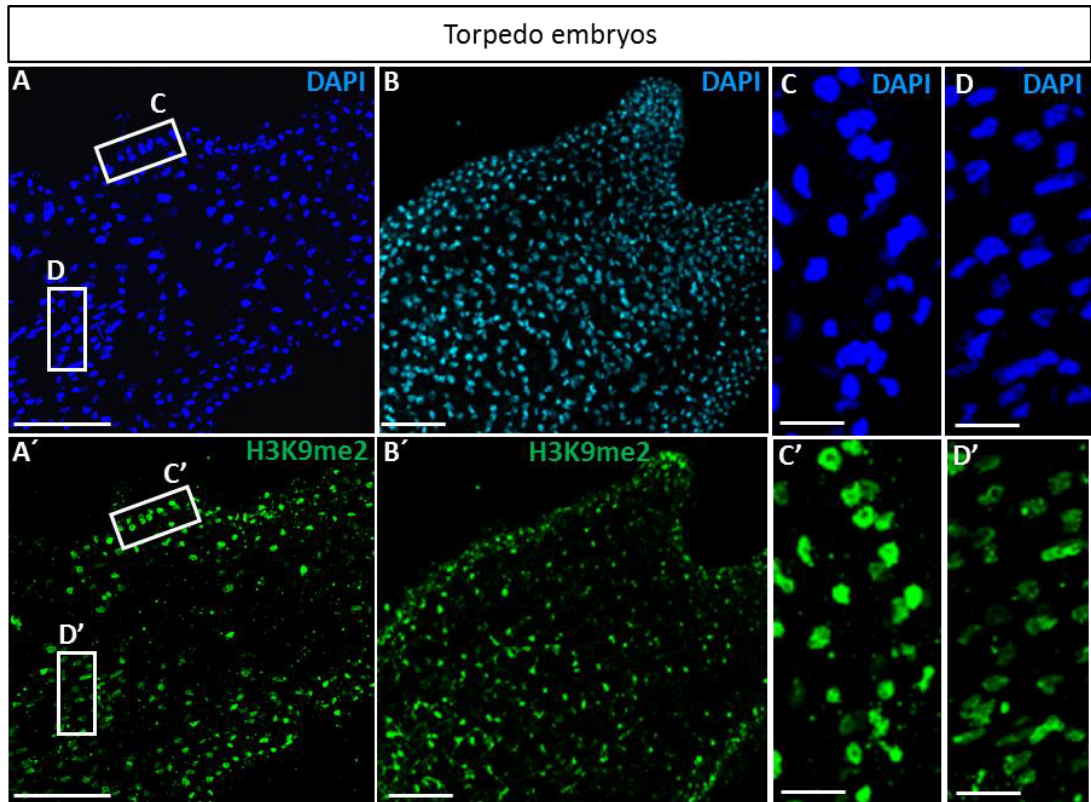


**Figure 2: Quantification of H3K9me2 Western blot fluorescence signals at different stages of microspore embryogenesis.** Each column represents the mean of two independent biological samples and two replicates. Bars indicate mean standard errors. Different letters on columns indicate significant differences according to ANOVA and Tukey's test at  $P \leq 0.05$ .



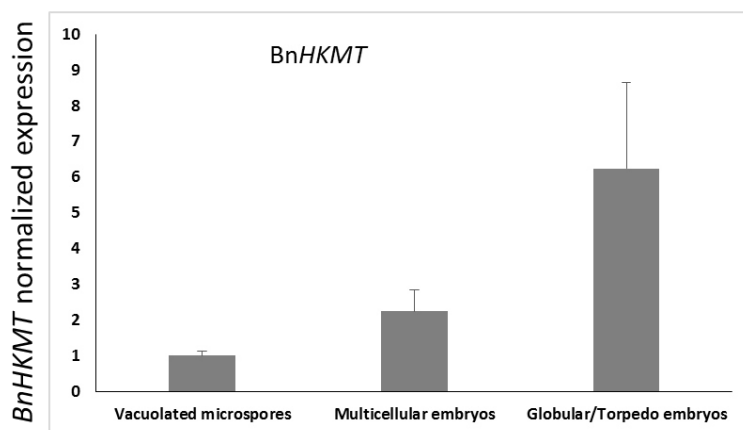
**Figure 3: Immunolocalization of H3K9me2 during early stages of microspore embryogenesis.** A, A', A'': Vacuolated microspore. B, B', B'': Multicellular embryo with exine. C, C': Early globular embryo. A, B: Differential interference contrast (DIC) images showing the cell structure. Arrowheads point the exine. A', B', C: DAPI staining showing the nuclei (blue). A'', B'', C': H3K9me2 immunofluorescence signal (green). Bars: 20  $\mu\text{m}$ .

signal was observed in other subcellular compartments. In some cases an unspecific autofluorescence signal was detected in the exine (Fig. 3A''). At later developmental stages, nuclei of globular stage embryos showed an intense immunofluorescence signal (Fig. 3C, C'). With progression of embryogenesis and initiation of differentiation events, in early (Fig. 4A, A') and advanced (Fig. 4B, B') torpedo stage embryos, different immunofluorescence distribution patterns were observed among embryo cells. The nuclei of differentiating peripheral cells of torpedo embryos exhibited higher H3K9me2 immunofluorescence (Fig. 4C, C'), whereas less intensity or no signal was observed in nuclei of other embryo regions with proliferating cells (Fig. 4D, D'). Nuclei of peripheral cells also showed an intense DAPI fluorescence, indicative of high chromatin condensation, while other cell nuclei of embryo inner regions exhibited less intense DAPI staining. No significant immunofluorescence signal was observed in control experiments avoiding the first antibody in all developmental stages analyzed.



**Figure 4: Immunolocalization of H3K9me2 during advanced stages of microspore embryogenesis.** Confocal images of nucleus DAPI staining (blue in A, C, D; cyan in B) and immunofluorescence signal (green in A', B', C', D'). A, A': Early torpedo embryo. B, B': Torpedo embryo. C, C': Higher magnification of the peripheral embryo region squared in A and A'. D, D': Higher magnification of the inner embryo region squared in A and A'. Bars in A, A', B, B': 100  $\mu$ m; in C, C', D, D': 20  $\mu$ m.

*BnHKMT* gene of *Brassica* is homologous to the *HKMT SUV4* gene of *Arabidopsis* which encodes a HKMT with preference for H3K9me1 as substrate (Thorstensen et al. 2006). The expression pattern of *BnHKMT* was analysed by quantitative real-time PCR (qPCR) at different stages of microspore embryogenesis. qPCR results showed that *BnHKMT* expression was developmentally up-regulated during microspore embryogenesis progression, observing the highest expression levels in globular/torpedo embryos (Fig. 5). The temporal expression pattern of *BnHKMT* was similar to the profile of H3K9me2 distribution during microspore embryogenesis (Figs. 2, 5).

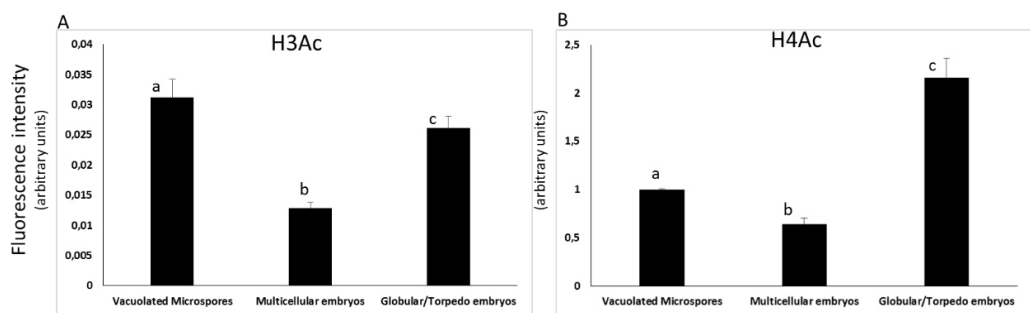


**Figure 5: qPCR analysis of *BnHKMT* gene expression during microspore embryogenesis.** Quantification of real-time RT-PCR amplification products of *BnHKMT* mRNA transcripts at different stages of microspore embryogenesis. Each column represents the mean of two independent reactions with two biological samples and two replicates of each reaction. Transcript levels were normalized to vacuolated microspore levels. Bars indicate the mean standard errors. Different letters on columns indicate significant differences according to ANOVA and Tukey's tests at  $P \leq 0.05$ .

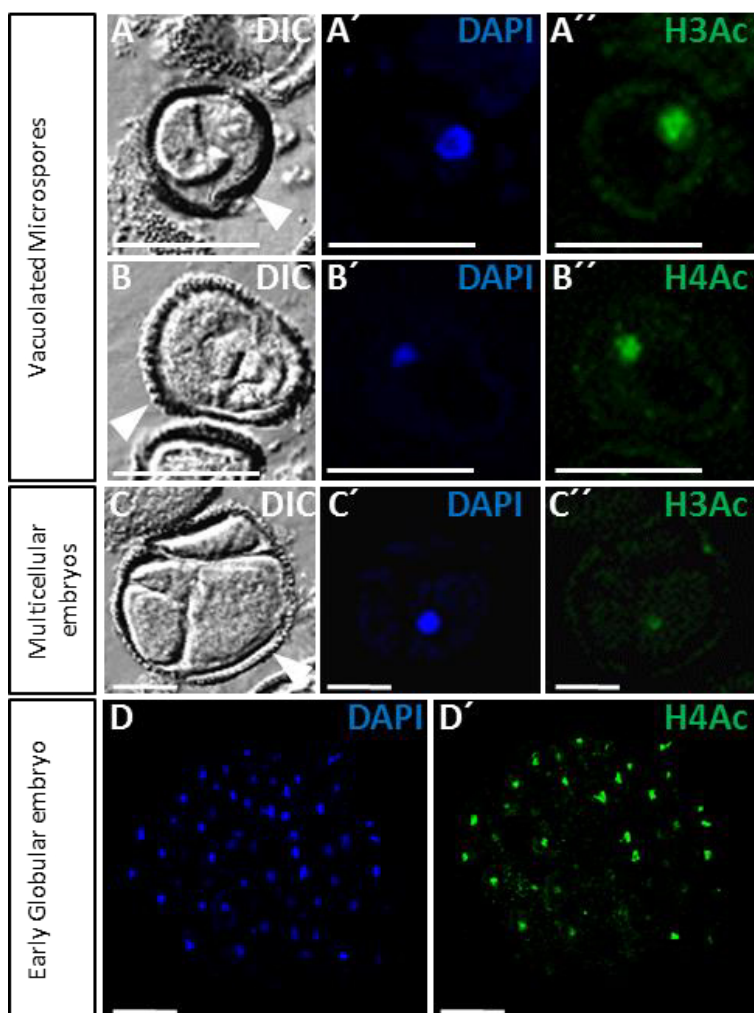
### **Histones H3Ac and H4Ac distribution and *BnHAT* expression patterns during microspore embryogenesis**

Changes in acetylation of histones H3 and H4 during microspore embryogenesis were analyzed by using specific antibodies recognizing the acetylated forms of H3 and H4 histones. Quantification of the Western blot signals showed similar profiles for both H3Ac and H4Ac during microspore embryogenesis, with the exception of a lower presence of H3Ac in globular and torpedo embryos (Fig. 6).

Both histone modifications showed high levels in vacuolated microspores, which decreased after embryogenesis induction in multicellular embryos and increased significantly in advanced embryogenesis stages (Fig. 6).

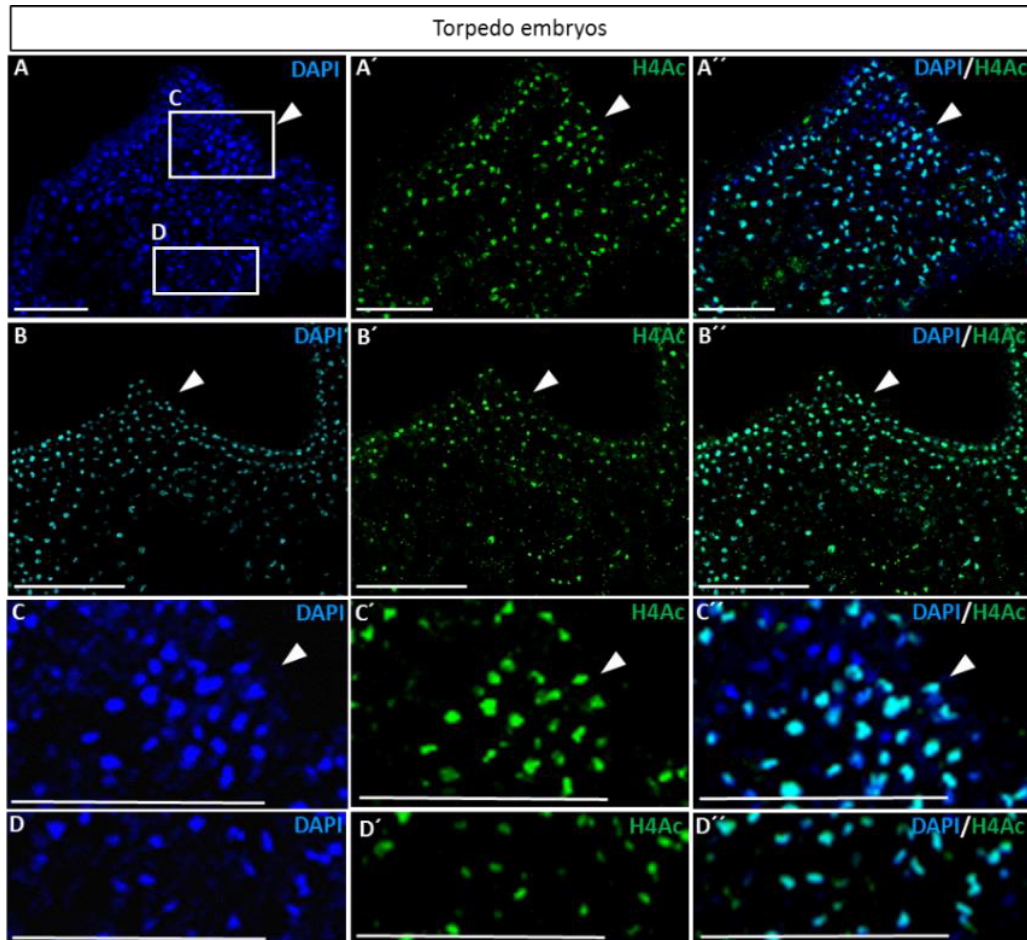


**Figure 6: Quantification of H3Ac (A) and H4Ac (B) Western blot fluorescence signals at different stages of microspore embryogenesis.** Each column represents the mean of two independent biological samples and two replicates. Bars indicate the mean standard errors. Different letters on columns indicate significant differences according to ANOVA and Tukey's test at  $P \leq 0.05$ .

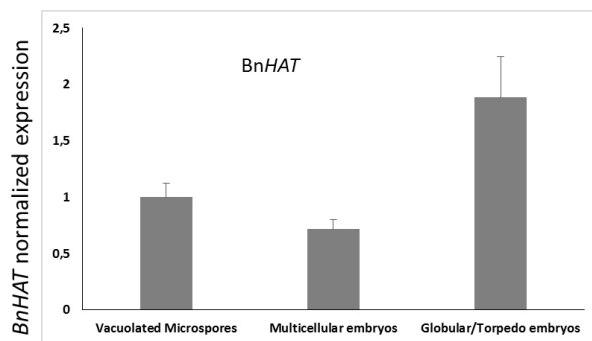


**Figure 7: Immunolocalization of H3Ac and H4Ac during early stages of microspore embryogenesis.** A, A', A'', B, B', B'': Vacuolated microspore. C, C', C'': Multicellular embryo with exine. D, D': Early globular embryo. A, B, C: DIC images of the cell structure. Arrowheads point the exine. A', B', C', D: DAPI staining for nuclei (blue). A'', C'': H3Ac immunofluorescence (green). B'', C'': H4Ac immunofluorescence (green). Bars: 20  $\mu\text{m}$ .

Immunofluorescence results showed similar distribution patterns of labelling for both H3Ac and H4Ac antibodies. Vacuolated microspore nuclei exhibited intense immunofluorescence with anti-H3Ac (Fig. 7A, A', A'') and anti-H4Ac antibodies (Fig. 7B, B', B''), whereas after embryogenesis induction multicellular embryo nuclei had a reduced signal (Fig. 7C, C', C''). Along embryogenesis progression, the immunofluorescence signal intensity increased in nuclei of globular stage embryos (Fig. 7D, D'). During advanced stages of development the distribution of acetylated histones differed among embryo cells. In early (Fig. 8A, A', A'') and late (Fig. 8B, B', B'') torpedo stage embryos, immunofluorescence signals were more intense in proliferating embryo cells like the apical meristem (arrowheads, Fig. 8C, C', C'') compared to other regions of the embryo (Fig. 8D, D', D''). No significant immunofluorescence signal was observed in control experiments avoiding the first antibody in all developmental stages analyzed.



**Figure 8: Immunolocalization of H4Ac during advanced stages of microspore embryogenesis.** Confocal images of nucleus DAPI staining (blue in A, C, D, and cyan in B), immunofluorescence signal (green in A', B', C', D') and merged images (A'', B'', C'', D''). A, A', A'': Torpedo embryo. B, B', B'': Detail of the apical part of a late torpedo-early cotyledonar embryo. C, C', C'': Higher magnification of the meristematic embryo region squared in A. D, D', D'': Higher magnification of the embryo region squared in A. Bars: 100  $\mu$ m. Arrowheads point the apical meristematic regions.



**Figure 9: qPCR analysis of BnHAT gene expression during microspore embryogenesis.** Quantification of real-time RT-PCR amplification products of BnHAT mRNA transcripts at different stages of microspore embryogenesis. Each column represents the mean of two independent reactions with two biological samples and two replicates of each reaction. Transcript levels were normalized to vacuolated microspore levels. Bars indicate the mean standard errors. Different letters on columns indicate significant differences according to ANOVA and Tukey's tests at  $P \leq 0.05$ .

The *HAT* gene of *Brassica napus* (BnHAT) is homologous to the *HAC5* gene of *Arabidopsis* which encodes a histone acetyltransferase that uses both H3 and H4 histones as substrates (Earley et al. 2007). Expression analysis of BnHAT by qPCR revealed a temporal expression pattern (Fig. 9) similar to the distribution profiles of acetylated histones (Fig. 6) during microspore embryogenesis. BnHAT was expressed in vacuolated microspores and after embryogenesis induction, being up-regulated during advanced embryogenesis stages (Fig. 9).

## DISCUSSION

The results of this study show that post-translational histone modifications dynamically change during microspore embryogenesis. Histone H3K9me2 methylation and H3/H4 acetylation have different temporal distribution profiles that are similar to the expression patterns of specific histone methyl and acetyl transferase genes, BnHKMT and BnHAT, revealing genome-wide epigenetic reprogramming events during microspore embryogenesis.

### **Increase of H3K9me2 during microspore embryogenesis occurs concomitantly with BnHKMT expression and is associated to embryo cell differentiation**

Our results revealed a progressive increase of H3K9me2 after microspore reprogramming and during embryo development, reaching the highest level in globular and torpedo stage embryos, indicating the association of this epigenetic mark with differentiation. Moreover, the immunolocalization revealed higher H3K9me2 signals in differentiating cells localized at the periphery of developing torpedo embryos, and characterized by more abundant heterochromatin. H3K9me2 has been associated with silenced transposable elements and heterochromatin in different plant systems (Saze et al. 2012; Liu et al. 2010). On the other hand, H3K9me2 is closely



associated with DNA methylation in plants and required for constitutive heterochromatin formation (Stancheva 2005; Zhou et al. 2010). The interplay between H3K9me2 and DNA methylation is critical for the maintenance of genome-wide transcriptional gene silencing and genome stability (Liu et al. 2010). Similar to H3K9me2, DNA methylation progressively increases during microspore embryogenesis, in particular at stages of embryo differentiation (Solís et al. 2012, El-Tantawy et al, in this volume). The reported changes in the levels of DNA methylation show a temporal profile similar to the H3K9me2 pattern presented here. Differentiating embryo cells, which exhibit larger heterochromatin masses, have higher levels of DNA methylation (Solís et al. 2012). Similarly, we identified differential distribution of H3K9me2 among differentiating and proliferating embryo cells, suggesting that both epigenetic marks, DNA methylation and H3K9me2, are closely associated in embryo cells and increased with cell differentiation, accompanying heterochromatinization. Chromatin condensation has been shown to increase during pollen development and after microspore reprogramming and embryo cell differentiation (Testillano et al. 2000; Testillano et al. 2005; Seguí-Simarro et al. 2011; Solís et al. 2012). Different patterns of chromatin condensation, DNA methylation, histone H3K9 methylation and some H3 variants have been also found between the generative and the vegetative nuclei of mature pollen in different species (Houben et al. 2011; Seguí-Simarro et al. 2011; Banaei-Moghaddan et al. 2012; Solís et al. 2012; Hoffman and Palmgren 2013; González-Sánchez et al. 2014), these differences have been related to different transcriptional activities and fates of both cells. Together, our data highlight a dynamic change of chromatin structure during microspore embryogenesis that is accompanied by changes of H3K9me2.

The expression analysis showed that *BnHKMT* gene was up-regulated during microspore embryogenesis and showed a similar pattern than the distribution profile of H3K9me2 at the same developmental stages. Increased levels of H3K9me2 during microspore embryogenesis occur concomitantly with increased expression of *BnHKMT*, suggesting that *BnHKMT* is responsible for establishing H3K9me2, an epigenetic mark associated with chromatin condensation and differentiation events throughout microspore embryogenesis.

### **H3Ac and H4Ac change during microspore embryogenesis in relation to *BnHAT* expression and are associated with totipotent and proliferating cells**

In contrast with H3K9me2, acetylated histones were found at high levels in the vacuolated microspore before embryogenesis induction. High level of chromatin decondensation has been reported by electron microscopy analysis in vacuolated microspores of *Brassica napus* (Seguí-Simarro et al. 2011). This decondensed pattern is related to high transcriptional activity at this

developmental stage (Testillano et al. 2005). Histone acetylation is normally correlated with increased gene activity (Liu et al. 2012). DNA methylation and H4 deacetylation act simultaneously and coordinately, restructuring the chromatin and regulating the gene expression during floral differentiation (Meijón et al. 2009). Low DNA methylation (Solís et al. 2012) and high H3 acetylation in the vacuolated microspore nucleus are in agreement with the high transcriptional activity and decondensed chromatin pattern of the vacuolated microspores of *Brassica napus* and other species (Testillano et al. 2005; Seguí-Simarro et al. 2011; Solís et al. 2012).

The genome of animal and plant totipotent stem cells is characterized by unique epigenetic features and a decondensed chromatin conformation (Grafi et al. 2011; Hezroni et al. 2011; Onder et al. 2012); the open chromatin configuration has emerged as fundamental feature of plant totipotent cells which might confer cells with the capacity for rapid switching into a new transcriptional program upon induction (Grafi et al. 2011). Chromatin-modifying enzymes, including HATs, have been proposed as modulators of cell reprogramming by affecting the genome-wide distribution of permissive/active histone modification marks (like H3 and H4 acetylation) and promoting the open chromatin states (Onder et al. 2012). Recent evidences have revealed that epigenetic variations play crucial roles in the reprogramming capacity of animal embryonic stem cell lines in which high cell reprogramming potency was associated with high levels of H3Ac, while reduced reprogramming capacity was restored by increasing the H3Ac levels by treatments with histone deacetylase inhibitors (Hezroni et al. 2011). Our results showed high levels of H3Ac and H4Ac in the vacuolated microspore, a totipotent cell with capacity of reprogramming and re-entry into the cell cycle upon induction, providing new evidences to histone acetylation as modulators of cell totipotent state and cell reprogramming.

Histone acetylation showed low levels after stress treatment and embryogenesis initiation while it significantly increased at advanced embryo developmental stages. Interestingly, immunolocalization results showed intense H3Ac and H4Ac signals over meristematic embryo cell nuclei at advanced stages of development. DNA demethylation followed by increased H3 and H4 histone acetylation occur concomitantly during cell cycle re-activation processes, like meristem dormancy exit and resumption of rapid growth in potatoes (Law and Shuttle 2004). Several mutants in *Arabidopsis* *HAT* genes are affected in different aspects of plant growth and development, some of them having a decreased cell division rate (Nellisen et al. 2005); other *HAT* genes are required for cell division during gametogenesis (Latrasse et al. 2008). Our results showed that the expression pattern of *BnHAT* is similar to the temporal profiles of acetylated histones during microspore embryogenesis. These results are in agreement with the involvement of histone



acetylation and acetyl transferases in the activation of cell division reported in other plant systems (Servet et al. 2010; Meijón et al. 2009) and suggest its association with cell division activities in proliferating embryo cells.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

Work supported by Spanish Ministry of Economy and Competitivity (MINECO) project BFU2011-23752 and Spanish National Research Council (CSIC) project PIE 201020E038. HRS is recipient of a FPI predoctoral fellowship of MINECO (BES-2009-014245) and performed a short stay granted by the MINECO (EEBB-2012-04037) in the Swedish University of Agricultural Sciences to do part of this work.

**PUBLICACION II:**

**Auxin biosynthesis, action and transport are involved in stress-induced microspore embryogenesis initiation and progression in *Brassica napus* L.**

Referencia:

**Rodríguez-Sanz, H.,** Solís, M.T., López, M.F., Gómez-Cadenas, A., Risueño, M.C., Testillano, P.S. (2014) Auxin biosynthesis, action and transport are involved in stress-induced microspore embryogenesis initiation and progression in *Brassica napus* L. *Plant and Cell Physiology* In revision.



## Resumen de la PUBLICACIÓN II:

### **La biosíntesis, acción y transporte de auxina están implicados en el inicio y progresión de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés en *Brassica napus* L.**

Las microsporas aisladas de *Brassica napus* pueden ser reprogramadas a embriogénesis *in vitro* mediante un tratamiento de estrés por temperatura, en un medio libre de reguladores de crecimiento, produciendo embriones de los que se pueden regenerar plantas haploides y doble-haploides, lo que constituye un sistema de estudio único sobre el mecanismo celular de la reprogramación y la embriogénesis.

Entre las hormonas y los reguladores mayoritarios del crecimiento en plantas, las auxinas están implicadas en numerosos procesos de desarrollo, entre ellos, la embriogénesis cigótica, pero todavía no hay información del papel que juega el ácido indol-acético o “indol-acetic acid” (IAA), forma mayoritaria de las auxinas endógenas, en la embriogénesis del polen *in vitro* inducida por estrés.

En este trabajo se ha estudiado la presencia y distribución de auxina endógena durante la inducción y progresión de la embriogénesis en cultivos de microsporas aisladas de *Brassica napus*, sistema *in vitro* en el que se induce la reprogramación de la microspora a la ruta embriogénica mediante un tratamiento de estrés por calor a 32°C.

En este estudio se han cuantificado los niveles de IAA endógeno en las distintas etapas de la embriogénesis de polen mediante cromatografía líquida unida a un espectrómetro de masas a través de una interfase de electrospray (“LC-ESI/MSMS”) se ha analizado su distribución celular y en regiones del embrión mediante inmunofluorescencia, con anticuerpos específicos anti-IAA, en microscopia laser confocal, y se ha estudiado la expresión de BnNIT2, gen de la ruta de biosíntesis de IAA que codifica la enzima responsable de la conversión del “indol-3-acetonitrilo” (IAN) a IAA. Se ha realizado también, un estudio de los efectos de la inhibición del transporte y acción del IAA mediante “N-1-naphthylphthalamic acid” (NPA) y “P-chlorophenoxyisobutyric acid” (PCIB) respectivamente analizando muestras en las principales etapas de la embriogénesis de polen tanto en cultivos tratados como en cultivos control.

Los resultados indican que hay una síntesis *de novo* de IAA desde las primeras etapas de la embriogénesis del polen y un progresivo incremento en la concentración de IAA durante el progreso de la embriogénesis. Además se ha detectado una mayor expresión de BnNIT2 después de la inducción de embriogénesis y durante el desarrollo embrionario. La distribución del IAA en embriones en etapas tempranas es homogénea, mientras que en etapas más avanzadas, corazón-

torpedo, la distribución cambia y el IAA se acumula en las regiones apical y basal del embrión. Los tratamientos con el bloqueante de transporte de IAA, NPA, y el inhibidor de acción de IAA, PCIB, afectan a la embriogénesis del polen y reducen el número total de embriones formados, además el NPA modifica el patrón polarizado de distribución del IAA en los embriones corazón-torpedo.

Estos resultados descritos por primera vez en este sistema indican que la biosíntesis endógena *de novo* de IAA, su transporte y acción, están implicadas en la iniciación y el desarrollo de la embriogénesis del polen.

## Publicación II:

# AUXIN BIOSYNTHESIS, ACTION AND TRANSPORT ARE INVOLVED IN STRESS-INDUCED MICROSPORE EMBRYOGENESIS INITIATION AND PROGRESSION IN *Brassica napus* L.

## ABSTRACT

Stress-induced microspore embryogenesis constitutes a convenient system for studying cell reprogramming and embryogenesis initiation mechanisms. Isolated microspores can be reprogrammed *in vitro* towards embryogenesis by stress treatments becoming totipotent cells and producing embryos which regenerate haploid and double-haploid plants. In this study, microspore embryogenesis is induced in *Brassica napus* by heat treatment in a culture medium free of plant growth regulators. No evidence on the role and dynamics of endogenous indol-acetic acid (IAA) on microspore embryogenesis is available, despite the abundant data on the auxin involvement in plant development. In this work, endogenous IAA levels and distribution patterns, expression of BnNIT2 encoding a nitrilase involved in the secondary auxin biosynthetic pathway of the indol-3-acetonitrile (IAN), and effects of inhibition of IAA transport and action by N-1-naphthylphthalamic acid (NPA) and  $\alpha$ -(p-Chlorophenoxy) isobutyric acid (PCIB) treatments were analyzed for the first time during *B. napus* microspore embryogenesis.

Results indicated *de novo* synthesis of IAA after stress-induced reprogramming of the microspore and embryogenesis initiation, accompanying the first embryogenic divisions, and a progressive increase of IAA concentration with embryo development which correlated with BnNIT2 expression. Auxin distribution was even in early embryos, whereas in heart-torpedo embryos IAA was unevenly distributed and accumulated in apical and basal regions. Inhibitions of both polar auxin transport and action by NPA and PCIB impaired embryo development, indicating that IAA transport and action are required for microspore-derived embryo formation. NPA also modified the IAA distribution pattern in embryos and lead to auxin accumulation in small cytoplasmic compartments. These findings indicate that endogenous auxin biosynthesis, action and transport are involved in microspore embryogenesis initiation and development.

## INTRODUCTION

Isolated microspores, at the developmental stage of vacuolated microspore, can be reprogrammed *in vitro* towards embryogenesis by stress treatments becoming totipotent cells and giving rise to embryos and plants (Bárány et al. 2005; Prem et al. 2012). Microspore embryogenesis constitutes

an intriguing system in which a cell is reprogrammed from its genetically controlled gametophytic program towards an embryogenic pathway. This process is a widely used method to generate genetic variability by obtaining microspore-derived embryos and double-haploid plants with many applications for plant breeding (Maluszynski et al. 2003). Since microspores are separated from the anther tissues, isolated microspore cultures constitute very convenient systems for studying the mechanisms underlying the reprogramming and totipotency acquisition of the vacuolated microspore, its epigenetic regulation (Solís et al. 2012; El-Tantawy et al. 2014; Rodríguez-Sanz et al. 2014), the role of arabinogalactan proteins (AGPs) and secreted factors (Testillano et al. 2010; El-Tantawy et al. 2013), the response to the inductive stress, the role of reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO) and programmed cell death (Seguí-Simarro et al. 2005; Rodríguez-Serrano et al. 2012; Solís et al. 2013), and the proliferation and differentiation events during embryo formation (Forster et al. 2007; Bárány et al. 2005; Solís et al. 2012). Despite the work performed in the last decades, factors responsible for embryogenesis initiation and embryo development in established cultures are still largely unknown and the effects of plant growth regulators (PGRs) on the process are not yet completely understood.

The PGR auxin, the predominant form of which is indole-3-acetic acid (IAA), is a major coordinating signal in the regulation of plant development, with key functions in stem and coleoptiles growth (Prashad and Dhonukshe 2013), lateral root initiation (Himanen et al. 2002), new stem cells specification at root lateral prebranching sites by oscillating gene expression (Moreno-Risueño et al. 2010), and also in embryo patterning, polarization and differentiation (Möller and Weijers 2009; Rademacher et al. 2012). Different pathways leading from auxin perception to gene expression and to non-transcriptional responses have been identified in the last decades, auxin signal being perceived by specific receptor systems (Rademacher et al. 2011; Rademacher et al. 2012, reviewed in Peer 2013). Many aspects of auxin action depend on its local biosynthesis and differential distribution within plant tissues, mainly regulated by its directional transport between cells (Petrášek and Friml 2009). Evidences about the roles of auxin in embryo development come from studies in *Arabidopsis* by using expression analysis of the synthetic auxin-responsive promoter *DR5* and auxin carrier genes *PINs*, and mutants of auxin-related genes (Teale et al. 2006; Robert et al. 2013), but the information on other plants is limited since *DR5* reporter assays are not available for many species and data mainly come from somatic embryogenesis *in vitro* systems, most of which use exogenous PGRs in the culture media (Larsson et al. 2008; Hakman et al. 2009; Abrahamson et al. 2012). In this sense, the use of IAA antibodies is a useful approach to analyze auxin distribution during developmental processes in various plant species (Schlicht et al. 2006; Forestan et al. 2010; Krouk et al. 2010). Microspore embryogenesis of *B. napus*

constitutes a convenient system for analyzing auxin function during embryogenesis since the process is induced and embryo is developed and differentiated *in vitro* from individual isolated cells without addition of PGRs at any stage.

The auxin efflux carrier PIN proteins have been identified as the key regulators of auxin-mediated developmental processes. Auxin efflux is proportional to the degree of PIN expression and its polar localization, and the entire process is sensitive to polar auxin transport inhibitors like N-1-naphthylphthalamic acid (NPA). NPA inhibits polar transport by preventing auxin efflux and it is believed to interfere with auxin transport by binding to proteins associated with the efflux carrier, *i. e.* the PIN proteins. Auxin abundance regulates PIN gene expression, localization, and degradation, forming a complex feedback loop between auxin and its transport amount and directionality (Prashad and Dhonukshe 2013). The implication of polar auxin transport in somatic embryo development has been studied using NPA whose inhibition of auxin transport interferes normal embryo patterning in several plant species (Liu et al. 1993; Hadfi et al. 1998; Hakman et al. 2009). *P*-chlorophenoxyisobutyric acid (PCIB) is an auxin antagonist which inhibits auxin action and therefore auxin-induced physiological effects are prevented (Xie et al. 2000), while it does not affect auxin influx or efflux, not functioning as an auxin transport inhibitor (Oono et al. 2003). Due to the structural similarity of PCIB with auxin and its competitive inhibition to auxin-induced responses, it is believed that PCIB inhibits the auxin action by competing with it at the auxin receptor and disturbing auxin signalling, however, the detailed mechanism of PCIB-mediated inhibition of auxin response is not characterized very well at the molecular level (Oono et al. 2003). Nevertheless, PCIB treatments have been most widely used to analyze IAA action in different developmental processes, constituting a useful tool in elucidating the mechanisms of auxin signal perception and transduction and its role in development (Oono et al. 2003; Ahmadi et al. 2012).

The auxin IAA is synthesized from indole either through the tryptophan (Trp) pathway or in a tryptophan-independent way. In Trp-dependent IAA biosynthesis, four pathways have been postulated: the indole-3-acetamide (IAM) pathway, the indole-3-pyruvic acid (IPyA) pathway, the tryptamine (TAM) pathway, and the indole-3-acetaldoxime (IAOX) pathway (reviews in Mano and Nemoto 2012; Brumos et al. 2014). Recent studies have shown that most of IAA in plants is produced through the IPyA pathway, whereas the IAOX pathway has not been found in plants other than *Brassicaceae* and considered secondary. In the final reaction of this pathway, plant nitrilases (NITs) convert indole-3-acetonitrile (IAN) to IAA; several *NIT* genes have been identified in *Arabidopsis* (Mano and Nemoto 2012) and *Brassica* (Ishikawa et al. 2007) and their



expression have been correlated with auxin-dependent developmental processes (Ishikawa et al. 2007).

Despite the abundant data on the auxin involvement in plant growth and development in many systems, the dynamics of endogenous auxin levels and localization during stress-induced microspore embryogenesis has not been analyzed yet. In the present work we have analyzed IAA levels and distribution, and expression of BnNIT2 gene, during microspore embryogenesis in *Brassica napus*, by using anti-IAA immunofluorescence and confocal analysis, qPCR, and liquid chromatography linked to mass spectrometry through an electrospray interface (LC/ESI-MSMS). The effects of inhibition of IAA transport and action were also analyzed by treatments with NPA and PCIB respectively. The results obtained indicate that endogenous auxin biosynthesis, action and transport are involved in microspore embryogenesis initiation and progression of embryo development.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Plant material and *in vitro* microspore culture**

*Brassica napus* L. cv. Topas donor plants were grown under controlled conditions at 15/10 °C in a 16/8 h light/dark cycle. Isolated microspore culture and embryogenesis induction was performed at 32°C, in liquid NLN-13 basal medium without plant growth regulators, as described by Prem et al. (2012). Microspores were isolated from selected flower buds containing vacuolated microspores, the responsive developmental stage for embryogenesis induction. They were carefully extracted from buds in cold NLN-13 medium (Duchefa) containing 13% sucrose (w/v); after washing and filtration steps, cell density was adjusted to 10.000 cells per mL and cell suspension was then poured into 90 mm Petri dishes (15 mL per Petri dish). After isolation, cultures were subjected to the temperature of 32.0 °C, stress treatment for embryogenesis induction, and checked every 2 days under stereomicroscope. After very few days, multicellular embryos, still surrounded by the exine were observed. Eight-ten days later, cultures were shifted to 25.0 °C on a gyratory shaker at 60 rpm until development of globular-heart and torpedo embryos, and complete embryo maturation, which was observed after around 30 days.

### **IAA levels quantification**

IAA concentration was analyzed by liquid chromatography linked to mass spectrometry through an electrospray interface, LC/ESI-MSMS, essentially as described in Durgbanshi et al. (2005) with slight modifications. Briefly, 100 mg fresh weight of microspore cultures at different developmental

stages were extracted in ultrapure water using a tissue homogenizer (Ultra-Turrax, Ika-Werke, Staufen, Germany) after spiking with 10 ng of d<sub>2</sub>-IAA. After extraction and centrifugation, pH of the supernatant was adjusted to 3.0 and partitioned twice against diethyl-ether (Panreac, Barcelona, Spain). The organic layer were combined and evaporated in a centrifuge vacuum evaporator (Jouan, Saint-Herblain, France). The dry residue was thereafter resuspended in a water:methanol (9:1) solution, filtered and injected in an UPLCTM Acquity system (Waters, Milford, MA, USA). Analyte was then separated in a reversed phase UPLC C18 column (Nucleodur C18, 1.8 µm 50 × 2.0 mm, Macherey- Nagel, Barcelona, España) using methanol and water supplemented with 0.01% acetic acid as solvents at a flow rate of 300 µl min<sup>-1</sup>. The mass spectrometer, a triple quadrupole (TQD, Micromass Ltd. RU) was operated in negative ionization electrospray mode. Two different biological samples and two replicates of each sample were performed per developmental stage. Differences in IAA concentration between the vacuolated microspore stage and the other developmental stages were tested by Student's *t*-test at  $P \leq 0.05$ .

#### **Treatments with PCIB and NPA in microspore cultures**

$\alpha$ -(*p*-Chlorophenoxy)-isobutyric acid, PCIB (Sigma), auxin action inhibitor, was added to the NLN-13 media, using a stock of 100 µM in ethanol, after filtering with a sterile Ministart filter, (Sartorius Biotech). This solution was added to the culture media at three different concentrations, 5 µM, 10 µM and 20 µM, to parallel plates of the same culture, keeping some plates as control.

*N*-1-Naphthylphthalamidic acid, NPA (Duchefa), auxin transport inhibitor, was added to the NLN-13 media, using a stock of 0.1 M NPA in DMSO, after filtering with a sterile Ministart filter, (Sartorius Biotech). The NPA was added to culture media of parallel plates of the same cultures to a final concentration of 3 µM, 10 µM and 40 µM, keeping some plates lacking NPA as controls.

To asses NPA and PCIB effects on embryogenesis efficiency, the number of mature cotyledonary embryos produced per plate was quantified after 30 days in treated and control cultures. 20 plates from three independent experiments were quantified from each treatment and control cultures. Pictures of plates of each treatment were taken. Only well-formed mature embryos were counted. Differences were tested by one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test at  $P \leq 0.05$ .

#### **Fixation and processing for IAA immunofluorescence**

Microspore culture samples were collected at different times and fixed overnight with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) at 4°C. Samples of the first stages containing

isolated vacuolated microspores and early multicellular embryos were previously embedded in gelatine, dehydrated and resin-embedded at low temperature. Large globular and torpedo embryos were processed either for cryostat or resin embedding. Samples from NPA-treated cultures were taken at the same time that the control cultures.

#### ***Processing for cryostat sectioning***

Fixed samples were washed in PBS, and cryoprotected through a gradual infiltration in sucrose solutions: 0.1M, 0.5M, 1 M, 1.5M and 2M for 1h each and 2.3 M overnight, at 4°C, embedded in Tissue-Tek optimal cutting temperature (OCT) compound and frozen on dry ice for sectioning in the cryostat (Leica CM 1950). 20-30 µm thick sections were collected on glass slides, washed with water to eliminate the OCT and transferred to a water drop over 3-aminopropyl-triethoxy-silane (APTES)-coated slides, air-dried and stored at -20°C until use for immunofluorescence (IF).

#### ***Processing for resin embedding and ultramicrotome sectioning***

Fixed samples were washed in PBS, dehydrated through an acetone series (30%, 50%, 70%, 90% and 100%) and embedded in Technovit 8100 resin (Kulzer, Germany) at 4°C. The blocks were sectioned at 1-2 µm thickness and stained with 1% toluidine blue for structural analysis, mounted with Eukitt and observed under bright field microscopy. Some sections were placed on APTES coated slides, air-dried, and stored at 4°C until use for immunofluorescence.

#### **IAA immunofluorescence**

Immunofluorescence (IF) was performed essentially as previously described by us (Solís et al. 2012; Prem et al. 2012) using resin sections for microspores and small embryo samples and cryostat sections for larger embryo samples. For cryostat sections, permeabilization was required prior to IF. After thawing the sections at room temperature, they were dehydrated and rehydrated in a methanol series (30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 90%, 70%, 50%, 30%, 5min each) and PBS. They were subsequently subjected to enzymatic digestion of cell walls for additional permeabilization by treatment with an enzymatic mixture (2.5% pectinase, 2.5% cellulase and 2.5% pectoliase) in PBS for 45 min. Semithin resin sections did not required permeabilization and were subjected directly to the immunodetection, after incubation in PBS for a few minutes. At this step, all section types followed the same protocol of IF.

Sections were first blocked with 10% foetal calf serum (FCS) in PBS for 10 min and incubated for 1h with anti-IAA mouse monoclonal antibodies (Sigma, Cat. n°: A 0855) diluted 1:100 in 1% BSA in PBS. After three rinsing steps in PBS, sections were incubated for 45 min in darkness with Alexa Fluor 488-labelled anti-mouse IgG antibody (Molecular Probes) diluted 1/25 in PBS for 45 min in

the dark. After washing in PBS, nuclei were stained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole), washed with PBS, mounted in Mowiol and examined in a confocal microscope (Leica TCS-SP2-AOBS, Vienna, Austria). Optical sections and maximum projections images were obtained with software running in conjunction with the confocal microscope (Leica software LCS version 2.5). Confocal microscopy analysis was performed using the same laser excitation and sample emission capture settings for image acquisition in all immunofluorescence preparations, allowing an accurate comparison among signals from cells at different developmental stages and the further quantification of the signal intensities.

Images of the same region of microspores and embryos at different developmental stages were captured by bright field, differential interference contrast (DIC) and IAA immunofluorescence (green), combined or not with DAPI fluorescence (blue), to unequivocally identify the structures and to establish a dynamic sequence of events of the IAA distribution at the different developmental stages.

#### **Controls of IAA immunofluorescence**

Negative controls were performed either by replacing the first antibody by PBS or by immunodepletion assays. The anti-IAA antibody was incubated with a solution of 5mg/ml synthetic IAA at 4°C overnight; the pre-blocked antibody solution was used as primary antibodies for immunofluorescence, following the same protocol and conditions described above.

#### **Quantification of IAA immunofluorescence signal intensity**

For each immunofluorescence microscopy preparation, confocal optical sections were collected at 1µm z-intervals, for cryostat sections, and at 0.1µm z-intervals for resin sections, with a total of 15 optical sections taken in the mid thickness of cryostat and resin sections for each developmental stage analyzed. Images of maximum projections were obtained and used for relative fluorescence intensity quantification with software running in conjunction with the confocal microscope (Leica software LCS version 2.5). Fluorescence intensity quantification was performed on vacuolated microspores, two-cell embryos, early multicellular and globular embryos, on random structures of each sample. Over 20 structures were measured per stage, repeating the experiment at least three times. Differences among stages were tested by one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test at  $P \leq 0.05$ .

#### **Quantitative real-time PCR (qPCR)**

The expression analysis of the nitrilase gene (*NIT2*) was performed by quantitative real-time PCR using the SsoAdvanced™SYBR®Green supermix on the iQ™5 Real-Time PCR Detection System

(Biorad). As PCR templates, cDNA was generated from total RNA isolated from the different culture samples at the analysed stages, using the Superscript™ II reverse transcriptase enzyme (Invitrogen), according to (Solís et al. 2012).

The oligonucleotides used were: 5' TGCCAGTTCTGCAAGCGTAAAG 3' and 3' ATCGTCGTACCAGTCGGTGAAC 5' from the sequence of the *NIT2* gene of *Brassica napus* (AF380304.1) which encodes a nitrilase-like protein (Ishikawa et al. 2007). All qPCR reactions were run in duplicates. Thermocycle settings were as follows: initial denaturation of 30 s at 95°C, followed by forty cycles, each consisting of 5 s at 95°C, 30 s at 56°C. After each run, a dissociation curve was acquired to check for amplification specificity by heating the samples from 65 to 95°C. Serial dilutions of cDNA were used to determine the efficiency curve of each primer pair according to (Solís et al. 2012).  $\beta$ -tubulin (*TUB*) and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 (*GAPDH.2*) were used as internal reference genes. At the end of the PCR cycles, the data were analyzed with the Bio-Rad CFX Manager 3.0 (3.0.1224.1015) (Biorad), using the Livak calculation method (Livak and Schmittgen 2001). Two independent reactions with two different biological samples and two replicates of each reaction were performed per developmental stage. Transcript levels were normalized to vacuolated microspore stage levels. Differences among stages were tested by one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test at  $P \leq 0.05$ .

## RESULTS

### Endogenous IAA levels during stress-induced microspore embryogenesis

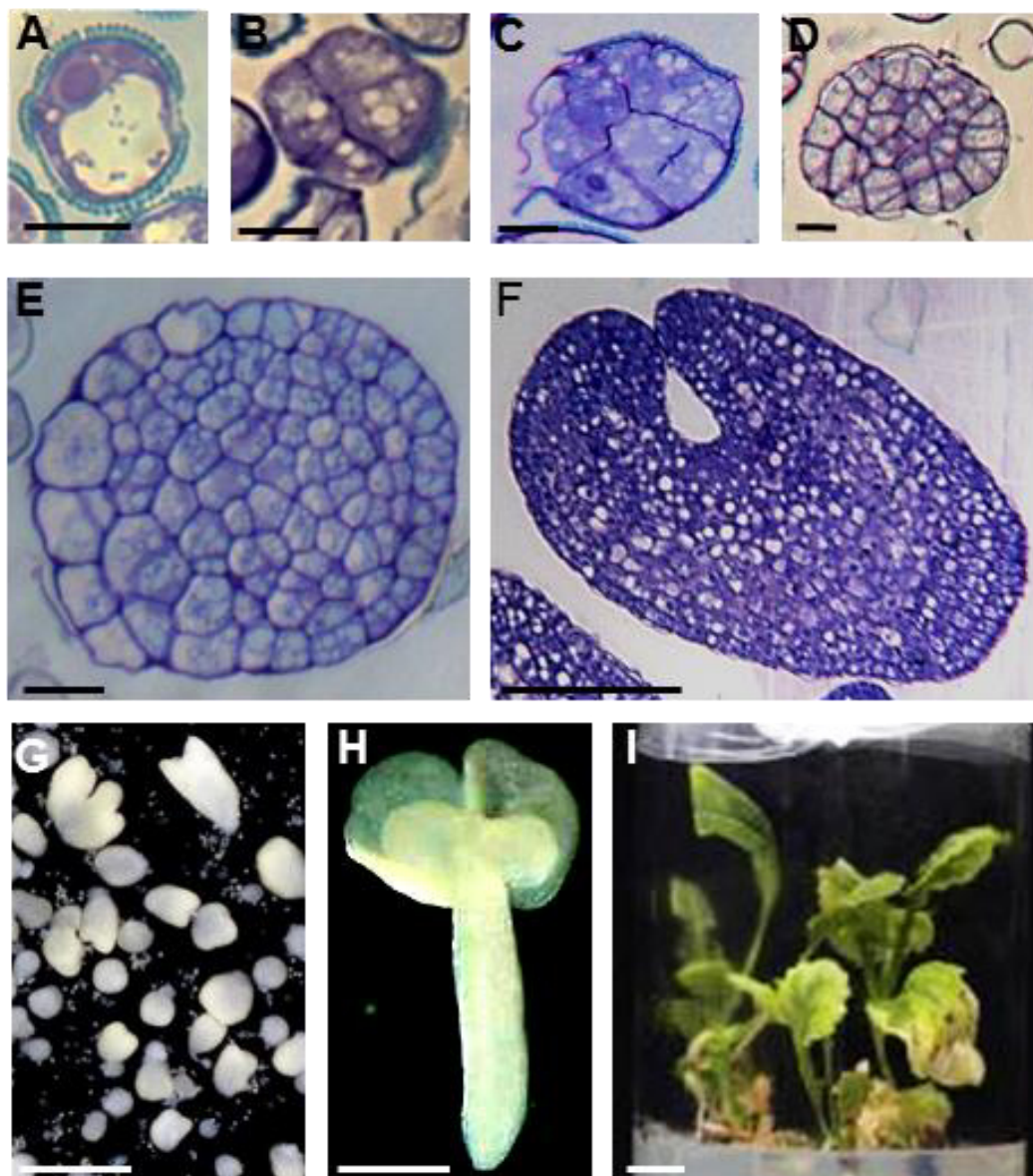
Microspore embryogenesis was induced in isolated microspore cultures of *Brassica napus* by heat treatment (32°C) in a culture medium free of plant growth regulators (Prem et al. 2012). Microspores were extracted from flower buds at the most responsive developmental stage for embryogenesis induction, vacuolated microspores (Fig. 1A) and subjected to the heat inductive treatment in culture. After a few days, responsive microspores divided and formed 2-4 cell embryos (Fig. 1B) which after subsequent divisions and the breakdown of the exine, the microspore wall, gave rise to early multicellular embryos (Fig. 1C, D). As embryogenesis proceeded, globular (Fig. 1E), heart-shaped and torpedo (Fig. 1F) embryos were observed in culture plates after 20 days in culture (Fig. 1G). Later in development, mature cotyledonary embryos (Fig. 1H) were formed and could germinate and regenerate plants (Fig. 1I) under appropriate *in vitro* conditions (Prem et al. 2012).

Changes in the endogenous levels of IAA during microspore embryogenesis were assessed by LC/ESI-MSMS analysis in the following developmental stages: vacuolated microspore before embryogenesis induction, early multicellular embryos, globular/torpedo embryos and cotyledonary embryos. Results of the IAA quantification are summarized in Figure 2. IAA concentration was low in vacuolated microspores at the culture initiation and kept at similar low levels a few days after embryogenesis induction, in culture samples containing early multicellular embryos. However, at advanced embryogenesis stages, in globular/torpedo embryos and cotyledonary embryos, IAA concentration progressively increased, the mean values being significantly different of that of the vacuolated microspore (Fig. 2).

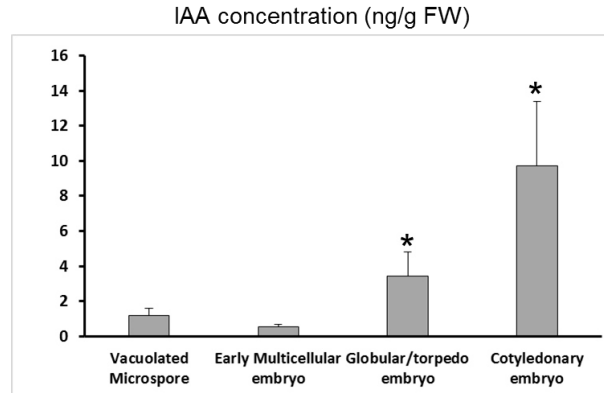
### **IAA immunolocalization after stress-induced microspore reprogramming and embryogenesis initiation**

Immunofluorescence with anti-IAA specific antibodies was performed to evaluate the *in situ* auxine distribution at different developmental stages of microspore embryogenesis. These assays were analysed by confocal microscopy using the same laser excitation and sample emission capture settings for image acquisition in all immunofluorescence preparations, allowing an accurate comparison among signals from cells at different developmental stages and the further quantification of the signal intensities. Controls by immunodepletion and by elimination of the first antibody were performed in every developmental stage to support the specificity of the immunofluorescence signals.

After embryogenesis induction, early multicellular embryos formed by 2-8 cells still surrounded by the exine could be found in the microspore cultures together with the non-responsive vacuolated microspores (Fig. 3A, A'). Different IAA immunofluorescence intensities were observed in these two types of structures, non-responsive vacuolated microspores showed very low labelling whereas early multicellular embryos of 2-8 cells exhibited IAA immunofluorescence signal of mid intensity (Fig. 3A, A', C, C'). Labelling was localized in the cytoplasm of early multicellular embryo cells, being the nuclei, cell walls and vacuoles negative (Fig. 3A, A', C, C'). The thick microspore wall, the exine, showed unspecific autofluorescence in microspores and early multicellular embryos (Fig. 3A, A'). Control experiments performed by avoiding the IAA antibody (Fig. 3B, B') and by immunodepletion did not show labelling over any cell of the two structures, non-responsive microspores and early multicellular embryos, except for the unspecific autofluorescence of the exine (Fig. 3B, B').



**Figure 1: Main developmental stages of stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus*.** **A:** Vacuolated microspore before embryogenesis induction. **B-F:** Early developmental stages after microspore embryogenesis induction showing different cellular size and structural organization. **A:** Vacuolated microspore. **B:** Early embryo with a few cells. **C:** Early multicellular embryo just after the exine breakdown. **D:** Early multicellular embryo without exine. **E:** Globular embryo. **F:** Torpedo embryo. **A-F:** Semithin sections stained with toluidine blue. **G-I:** Details of *in vitro* cultures at advanced stages. **G:** *In vitro* culture containing globular, heart and torpedo embryos. **H:** Mature cotyledonary embryo. **I:** Plantlet regenerated *in vitro* from microspore-derived embryos. Bars in A-E: 20  $\mu\text{m}$ , in F: 150  $\mu\text{m}$ , in G-H: 1 mm, in I: 10 mm.



**Figure 2: Quantification of endogenous IAA concentration during microspore embryogenesis.** Columns show mean IAA concentration in culture samples at different developmental stages, bars represent standard error of the mean. IAA content was low in vacuolated microspores before induction and in early multicellular embryos, while it significantly increased in globular/torpedo embryos and cotyledonary embryos. Asterisks indicate significant differences compared with the vacuolated microspore stage (*t*-test,  $P < 0.05$ ).

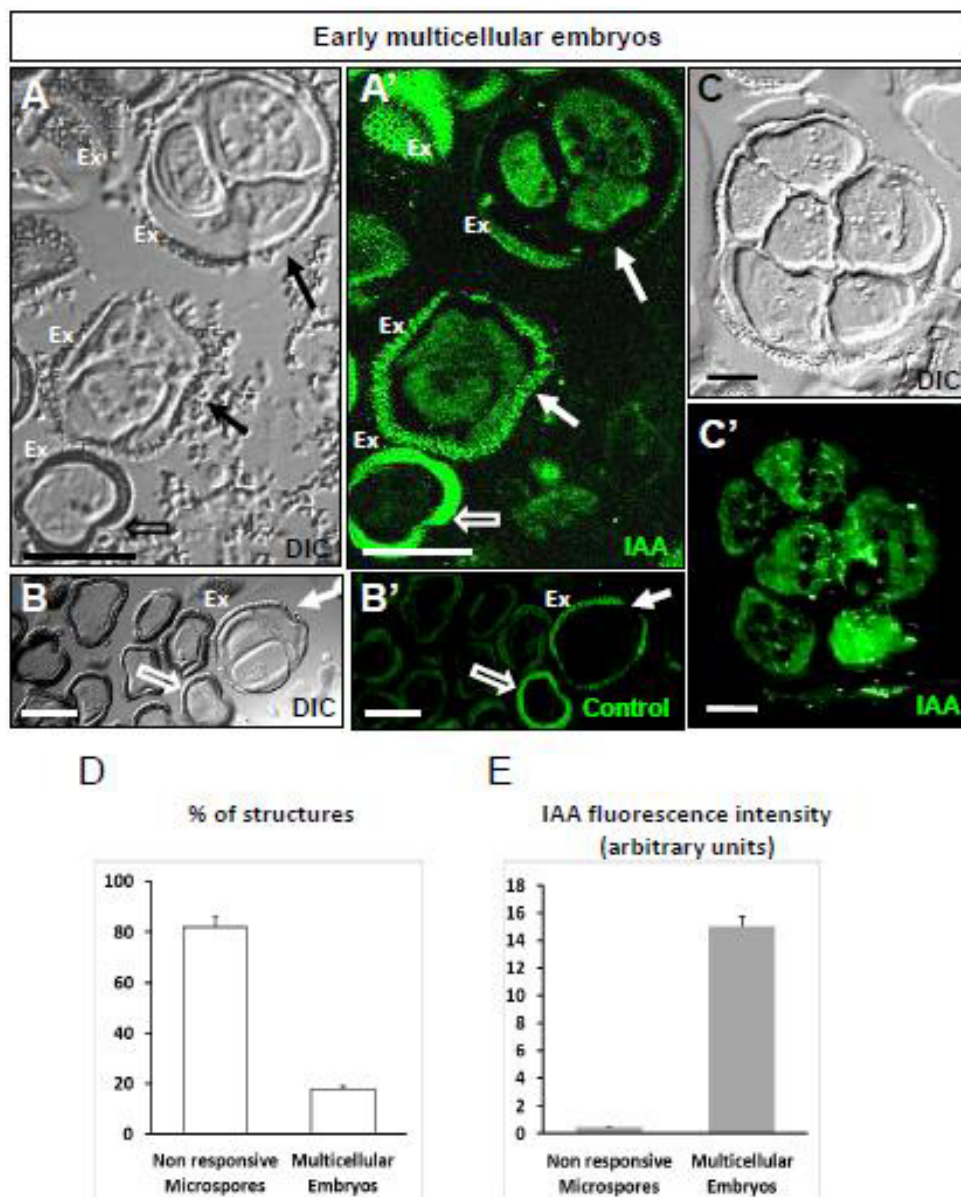
At this developmental stage, the proportion of early multicellular embryos was very low ( $18,0 \% \pm 0,9$ ) in comparison with the amount of non-responsive microspores ( $82,0 \% \pm 4,1$ ) present in the culture (Fig. 3D). The quantification of the immunofluorescence intensity per area in the two types of structures, non-responsive microspores and early multicellular embryos (Fig. 3E) clearly supported the qualitative results observed.

The relative fluorescence intensity of early embryo cells was significantly higher ( $15,00 \pm 0,75$ , fluorescence arbitrary units) than the signal intensity of the non-responsive microspores ( $0,46 \pm 0,02$ , fluorescence arbitrary units) (Fig. 3E) indicating that the level of endogenous IAA was much higher in early multicellular embryo cells at initial embryogenesis stages than in the microspores that did not respond to embryogenesis induction.

### IAA immunolocalization during microspore embryogenesis progression

To assess the dynamics of endogenous auxin during microspore embryogenesis initiation and progression, IAA immunolocalization was analyzed in cells during sequential developmental stages, before and after induction. Vacuolated microspores before the inductive treatment showed very low IAA fluorescence signal (Fig. 4A, A'), irregularly distributed in the cytoplasm, being the nucleus and vacuole free of labelling (Fig. 4A, A'); the microspore wall, the exine, showed unspecific autofluorescence (Fig. 4A, A'). After embryogenesis induction, the two-cell embryos which were formed by the first embryogenic divisions showed higher IAA immunofluorescence signal (Fig. 4B, B', C, C'). As embryogenesis proceeded and a few more cell divisions took place, in early multicellular embryos (Fig. 4D, D') and globular embryos (Fig. 4E, E'), IAA





**Figure 3: IAA immunolocalization after microspore embryogenesis induction, inearly multicellular embryos.** Differential interference contrast, DIC, images (A, B, C) and confocal IAA immunofluorescence (A', B', C') of the same structures. A, A': Microspore cultures after embryogenesis induction showing IAA labelling on cells of early multicellular embryos (arrows), whereas no signal is observed on non-responsive microspores (open arrows) also present in the culture. The thick microspore wall, the exine (Ex) displays unspecific autofluorescence. C, C': Higher magnification images of differential interference contrast, DIC (C) and IAA immunofluorescence (C') of a 6-cell embryo. B, B': Control experiment by avoiding the IAA antibody showing no signal in any structure except for the unspecific autofluorescence of the exine (Ex) neither in cells of early multicellular embryos (arrows) nor in non-responsive microspores (open arrows). Bars in micrographs represent 20  $\mu$ m. D: Percentage (mean  $\pm$  standard error) of the two types of structures coexisting in the culture samples at the early multicellular embryo stage: non-responsive vacuolated microspores (first column) and early multicellular embryos (second column). E: Quantification of IAA immunofluorescence signal intensity in the two types of structures found in the culture at the early multicellular embryo stage. Columns represent the mean values of relative fluorescence intensity, in arbitrary units, of non-responsive vacuolated microspores (first column) and early multicellular embryos (second column), as measured by confocal image analysis software on maximum projection images (details in Material and Methods). Bars indicate the standard error of the mean.

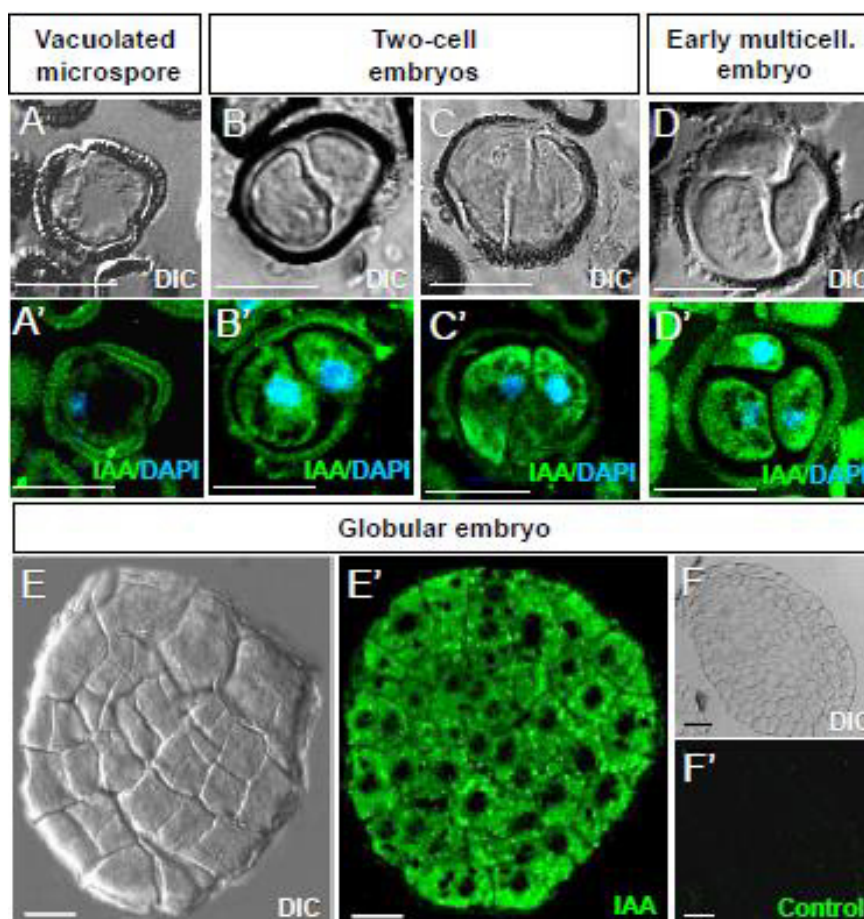
immunofluorescence intensity progressively increased, being localized in the cytoplasm of every cell in early multicellular and globular embryos (Fig. 4D, D', E, E'); vacuoles and other organelles as well as the cell walls appeared dark. Immunodepletion experiments by pre-blocking the anti-IAA antibody with IAA completely abolished the immunofluorescence signal in embryo cells at all developmental stages analyzed (Fig. 4F, F', 5C, C'), supporting the specificity of the immunofluorescence results and the absence of autofluorescence in developing embryos.

The quantification of the IAA immunofluorescence signals at different developmental stages (Fig. 4H) showed low IAA signal in vacuolated microspores before induction ( $2,06 \pm 0,10$ ) and a significant increase of the fluorescence intensity after embryogenesis induction, in two-cell embryos ( $9,70 \pm 0,48$ ) and early multicellular embryos ( $11,54 \pm 0,57$ ); later in development, in globular embryos, IAA signal again increased significantly ( $19,00 \pm 0,75$ ), which indicated a progressive increase of endogenous IAA levels during microspore embryogenesis progression (Fig. 4H).

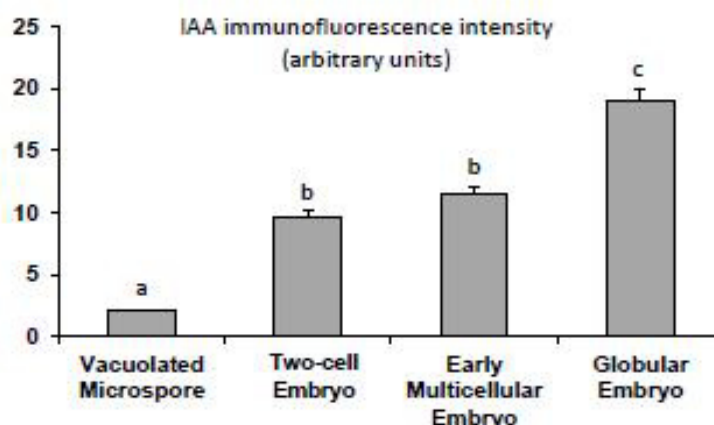
In heart and torpedo embryos, a differential distribution pattern of IAA was observed, being the IAA signal higher in the apical regions of the emerging cotyledons and the basal embryo region than in the centre (Fig. 5A, A'). In advanced torpedo embryos, a gradient in the IAA immunofluorescence signal intensity could be observed, from the cotyledon tip to the basal region (Fig. 5B).

### **BnNIT2 gene expression pattern during stress-induced microspore embryogenesis**

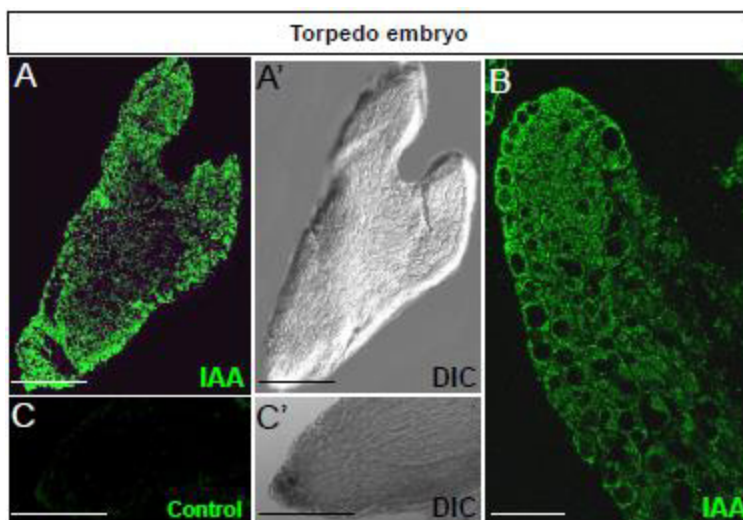
The *NIT2* gene encodes a nitrilase responsible of the conversion of indol-3-acetonitrile (IAN) to IAA in the secondary pathway of auxin biosynthesis found in *Brassicaceae* species producing indoglucosinolates (Mano and Nemoto 2012; Brumos et al. 2014). Thus, to obtain more information on the dynamics of *de novo* auxin production during microspore embryogenesis, the expression of the BnNIT2 gene was analysed. The results of the qPCR analysis at different embryogenesis developmental stages revealed a temporal expression pattern (Fig. 6) in which *NIT2* was highly up-regulated early after microspore embryogenesis induction, increasing the expression levels twenty times in early multicellular embryos in comparison with vacuolated microspores before the embryogenesis inductive treatment. At later stages, globular and torpedo embryos also showed high expression levels, similar to early multicellular embryos (Fig. 6).



G



**Figure 4: IAA immunolocalization during early stages of microspore embryogenesis.** Differential interference contrast, DIC, images (A, B, C, D, E, F) and confocal IAA immunofluorescence (A', B', C', D', E') of the same structures. A, A': Vacuolated microspore. B, B', C, C': Two-cell embryos. D, D': Early multicellular embryo. E, E': Globular embryo. F, F': Immunodepletion control experiment in globular embryos by in vitro pre-blocking of the antibody with IAA. Bars in micrographs indicate 20  $\mu$ m. G: Histogram with the quantification of the IAA immunofluorescence intensity (in arbitrary units). Columns represent the mean values ( $\pm$  standard error of the mean) of relative fluorescence intensity of vacuolated microspores (first column), two-cell embryos (second column), early multicellular embryos (third column) and globular embryos (fourth column), as measured by confocal image analysis software on maximum projection images (details in Material and Methods). Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

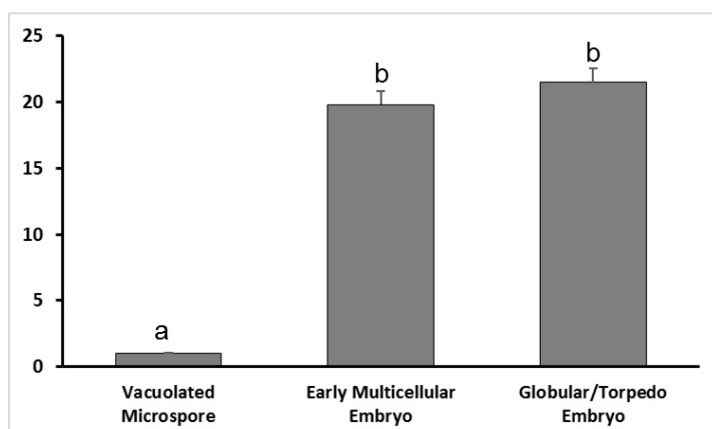


**Figure 5: IAA immunolocalization in torpedo embryos.** Confocal IAA immunofluorescence (A,B, C) and differential interference contrast, DIC, images (A', C') of the same structures. A, A': IAA signal concentrates in apical and basal embryo regions. B: Apical region of a torpedo embryo showing a gradient in the IAA immunofluorescence signal intensity, from the cotyledon tip to the basal region. C, C': Control experiment by avoiding the IAA antibody with no fluorescence signal nor autofluorescence of the basal region of a torpedo embryo. Bars indicate 100  $\mu$ m.

### Effects on stress-induced microspore embryogenesis of IAA action inhibition by PCIB

Treatments with *p*-chlorophenoxyisobutyric acid (PCIB), which inhibits the action of auxin by binding at auxin receptor site, were applied to microspore cultures at different concentrations and their effects on microspore embryogenesis progression were analyzed by the quantification of the mature cotyledonary embryos produced after 30 days. Control cultures produced numerous mature

BnNIT2 expression

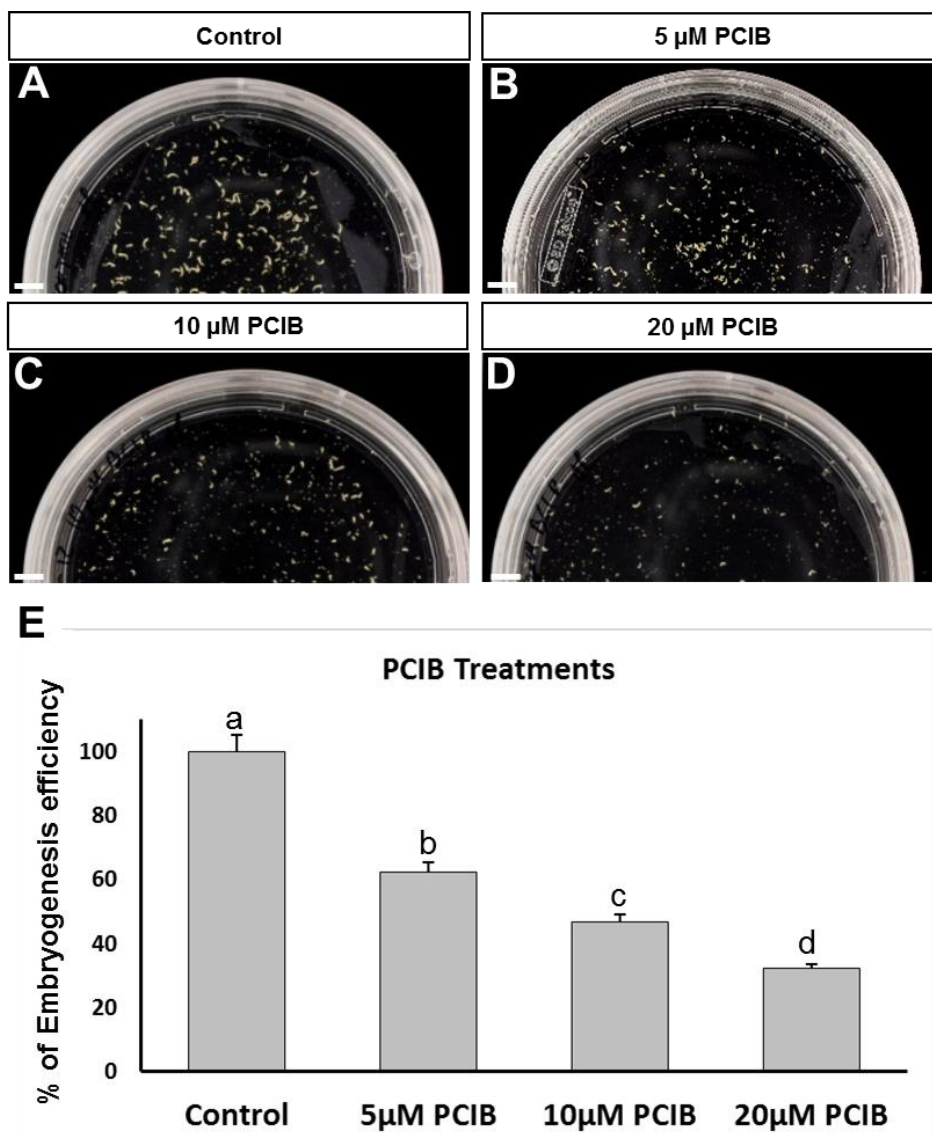


**Figure 6: Expression analysis of BnNIT2 by qPCR during microspore embryogenesis.** Quantification of real-time RT-PCR amplification products of BnNIT2mRNA transcripts at different stages of microspore embryogenesis. Each column represents the mean of two independent reactions with two biological samples and two replicates of each reaction. Transcript levels were normalized to vacuolated microspore levels. Bars indicate standard error of the mean. Different letters on columns indicate significant differences at  $P < 0.05$ .

embryos (Fig. 7A, A') whereas PCIB-treated cultures showed a significant decrease in the number of embryos (Fig. 7 B-D, B'-D'), the efficiency of embryo production being affected by the treatment in a dose-dependent manner. Quantification of the number of embryos produced at 30 days showed a significant decrease of mature cotyledonary embryo production in cultures treated with the auxin inhibitor (Fig. 7E). In comparison with the embryogenesis yield of control cultures which was normalized to 100%, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M and 20  $\mu$ M PCIB treatments decreased the embryo production to 62,40%, 46,70% and 32.14% respectively (Fig. 7E) indicating that the inhibition of auxin action strongly affected microspore-derived embryo development.

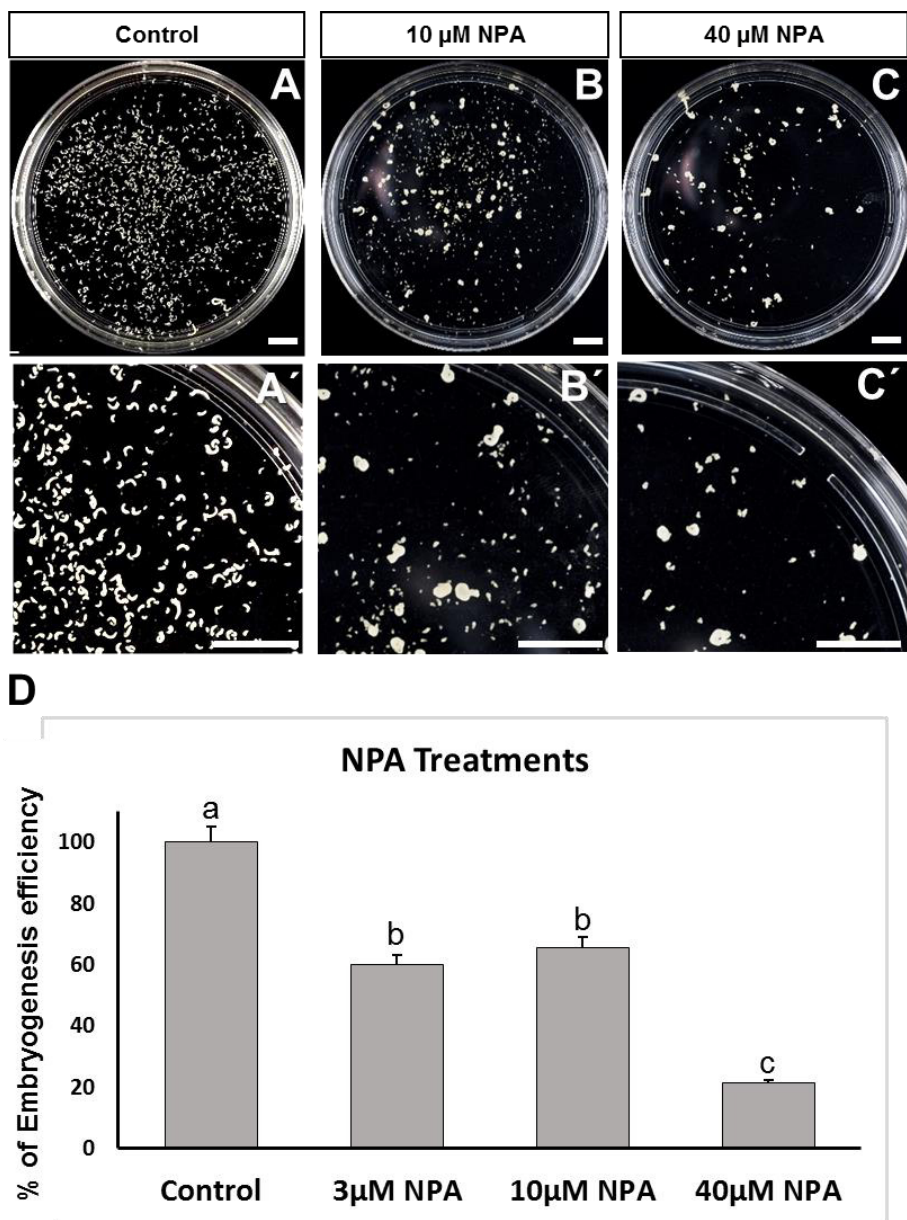
#### **Effects on stress-induced microspore embryogenesis of IAA transport inhibition by NPA**

The inhibitor of the polar auxin transport 1-*N*-naphthylphthalamic acid (NPA) was applied to *in vitro* microspore cultures at three different concentrations, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M and 40  $\mu$ M, which are in the range of concentrations used for treatments to seedlings and *in vitro* embryogenesis systems of different species to inhibit polar auxin transport (Esmon et al. 2006; Peer et al. 2009; Hakman et al. 2009; Larsson et al. 2012; Abrahamsson et al. 2012; Li et al. 2013). Under NPA treatment, embryo development was affected and the production of mature cotyledonary embryos significantly diminished (Fig. 8B, B', C, C') in comparison with control cultures (Fig. 8A, A'). Quantitative analysis of the mature embryo production revealed that in comparison with untreated control cultures, whose embryo production was normalized to 100%, plates containing 3  $\mu$ M and 10  $\mu$ M



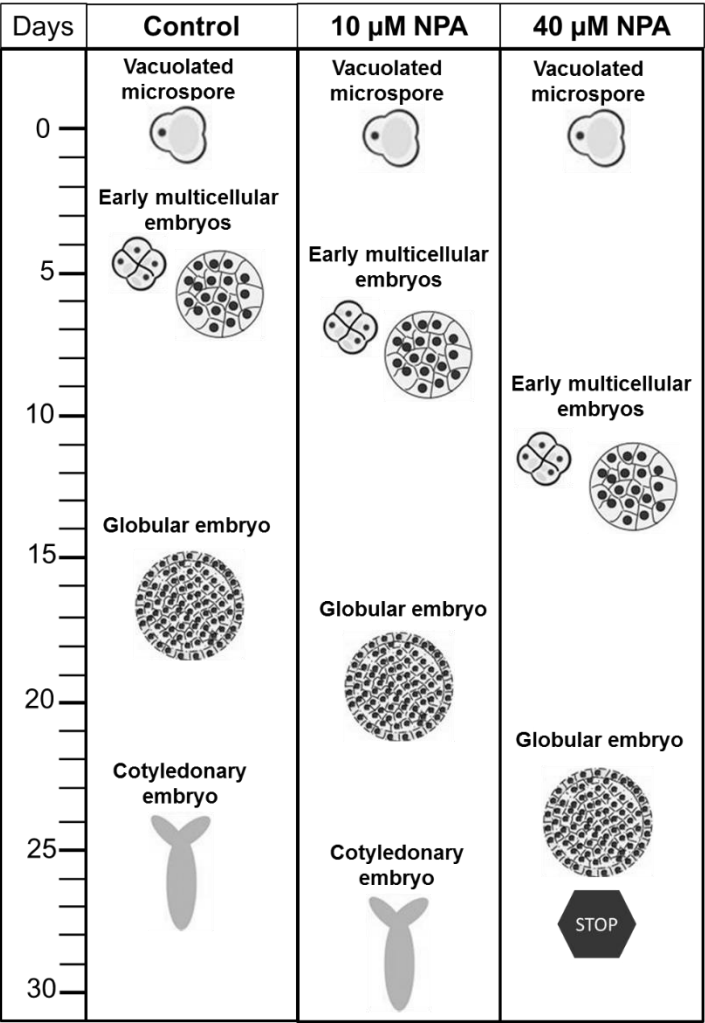
**Figure 7: Effects of IAA action inhibition by PCIB on microspore embryogenesis efficiency.** A-D, A'-D': In vitro culture plates showing the production of mature embryos by microspore embryogenesis in control cultures (A, A') and cultures treated with PCIB at 5μM (B, B'), 10 μM (C, C') and 20 μM (D, D') concentrations. A'-D': Details of the corresponding culture plates at higher magnification. Bars in pictures represent 10 mm. E: **Quantification of the microspore embryogenesis efficiency in control and PCIB-treated cultures at different concentrations.** Results are referred to the mean number of embryos formed in control cultures which has been normalized to 100%. Columns represent the mean percentage ( $\pm$  standard error of the mean) of mature embryos obtained in control cultures (first column), and in cultures treated with PCIB at 5μM (second column), 10 μM (third column) and 20 μM (fourth column) concentrations. Different letters on columns indicate significant differences at  $P < 0.05$ . Pictures and quantification were made after 30 days in culture.





**Figure 8:** Effects of IAA transport inhibition by NPA on microspore embryogenesis efficiency. **A-C, A'-C':** In vitro culture plates showing the production of mature embryos by microspore embryogenesis in control cultures (**A, A'**) and cultures treated with NPA at 10μM (**B, B'**) and 40 μM (**C, C'**) concentrations. **A'-C':** Details of the corresponding culture plates at higher magnification. Pictures were made after 30 days in culture. Bars in pictures represent 10 mm. **D: Quantification of the microspore embryogenesis efficiency in control and NPA-treated cultures at different concentrations.** Results are referred to the mean number of embryos formed in control cultures which has been normalized to 100%. Columns represent the mean percentage ( $\pm$  standard error of the mean) of mature embryos obtained in control cultures (first column), and in cultures treated with NPA at 3 μM (second column), 10 μM (third column) and 40 μM (fourth column) concentrations. Different letters on columns indicate significant differences at  $P < 0.05$ .

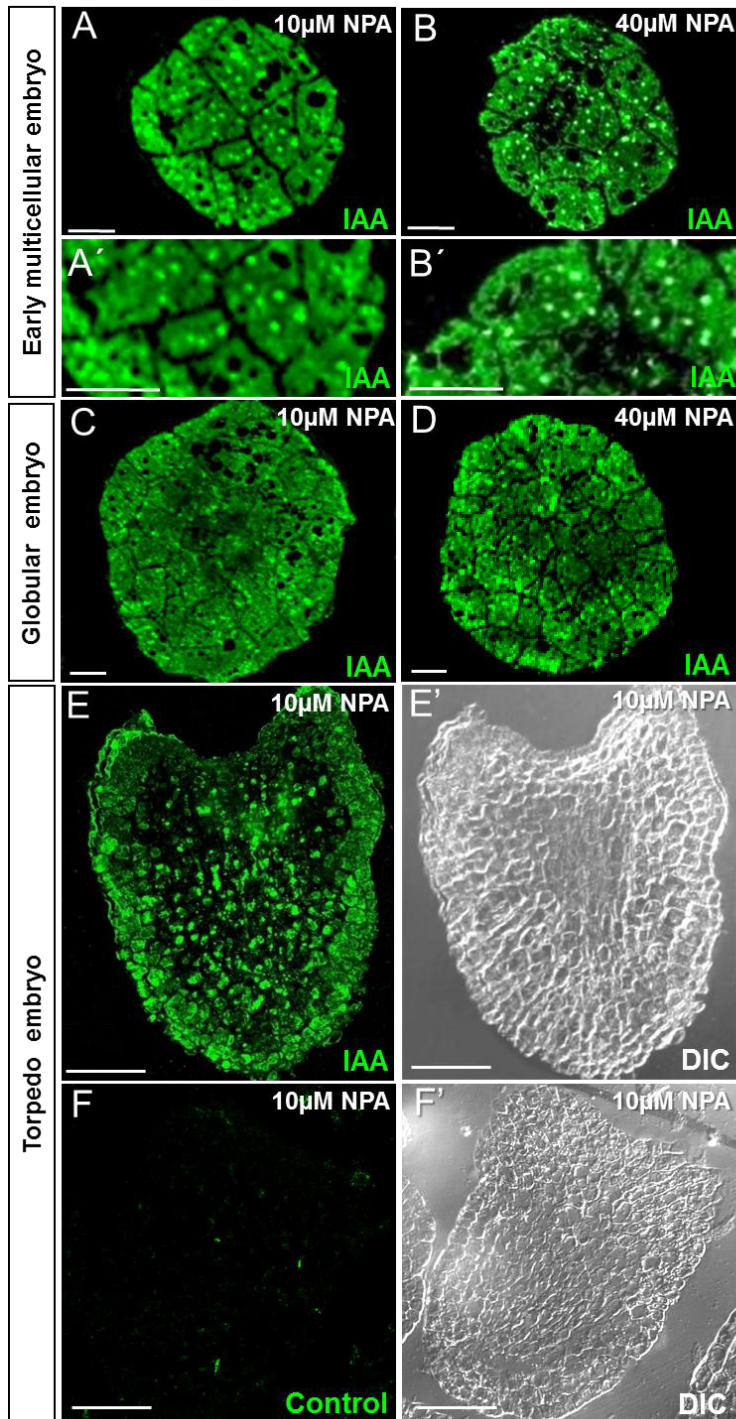
NPA showed decreased rates of embryogenesis efficiency, similar for both concentrations (61,10% for 3  $\mu$ M NPA, and 65,62% for 10  $\mu$ M NPA, not significant differences,  $P\leq 0.05$ ), while in cultures treated with a higher concentration of the inhibitor, 40  $\mu$ M NPA, embryo production drastically decreased to 21,25% (Fig. 8D). The mature embryos produced in NPA-treated cultures were bigger and thicker than the mature embryos developed in control cultures, showing slight modifications of their cotyledons and radicle (compare Fig. 8A' with 8B' and 8C')



**Figure 9: Effects of IAA transport inhibition by NPA on microspore embryogenesis progression.** Scheme illustrating the approximate time (days) in culture and the different stages of embryo development observed in control cultures in comparison with cultures treated with 10 and 40  $\mu$ M NPA. Both NPA concentrations produce delays in development, the higher concentration stops the development of most embryos at the globular stage.

Moreover, a significant delay in embryo development was observed in 10  $\mu$ M and 40  $\mu$ M NPA-treated cultures, effect that is schematized in Figure 9. At low NPA concentration early multicellular and globular embryos appeared 2-3 days later than in untreated control cultures, and





**Figure 10: IAA immunolocalization in NPA-treated cultures of microspore embryogenesis.** A-F: Confocal IAA immunofluorescence images of different embryogenesis developmental stages in NPA-treated cultures at 10 μM (A, A', C, E, F) and 40 μM (B, B', D) concentrations. A, B: Early multicellular embryos. A', B': Details at higher magnification of regions of the early multicellular embryos shown in A and B. C, D: Globular embryos. E, E', F, F': Early torpedo embryos, E', F': Differential interference contrast, DIC, images of the same embryos shown in E and F. F, F': Control experiment by avoiding the IAA antibody with no fluorescence signal nor autofluorescence in any region of the early torpedo embryo. Bars in A-D: 20 μm, in E-F: 50 μm.

cotyledonary embryos were formed at around 28 days, 3 days later than in controls. In cultures treated with 40  $\mu$ M NPA, the delay in development was higher, early multicellular and globular embryos being observed around 5-6 days later than in controls (Fig. 9). At this high concentration of the auxin transport inhibitor most embryos stopped development in the globular stage before the switch to bilateral symmetry and apical-basal embryo axis formation (Fig. 9); only a very low proportion of them reached the cotyledonary stage after 30 days in culture, almost one week later than control cultures.

The IAA immunolocalization assays of NPA-treated samples revealed changes in the auxin distribution pattern at different embryo developmental stages. In cultures where IAA transport was inhibited with 10  $\mu$ M and 40  $\mu$ M NPA treatments, early multicellular embryos showed an intense IAA signal in the cytoplasm (Fig. 10A, B) with brighter spots of different sizes in certain regions of the cytoplasm, indicating the accumulation of IAA in small subcellular compartments (Fig. 10A', B'). In globular embryos of NPA-treated cultures, at the two concentrations, IAA was localized homogeneously in the cytoplasm of all embryo cells which also showed brighter signals in some cytoplasmic regions or compartments (Fig. 10C, D). In the scarce embryos that reached the torpedo stage in NPA-containing cultures, IAA showed an abnormal pattern of distribution. In contrast with the localization in apical and basal regions of normal torpedo embryos, IAA was equally distributed along the embryo axis, in the peripheral cells and in some cells of the central region (Fig. 10E, E'). Controls avoiding the first antibody in NPA-treated embryos did not show any signal in any developmental stage, including torpedo embryos (Fig. 10F, F').

## DISCUSSION

### **Endogenous auxin increases after microspore reprogramming and first embryogenic divisions in early multicellular embryo cells**

The analysis performed by LC/ESI-MSMS show that before the application of the embryogenesis inductive treatment, isolated microspores contain low levels of IAA which progressively increases after induction and during microspore embryogenesis progression. The fact that after embryogenesis induction, in *in vitro* culture samples at the early multicellular embryos stage, the quantification by LC/ESI-MSMS showed low IAA concentration, not significantly different from vacuolated microspores before embryogenesis induction, can be explained by the low number and small size of the early multicellular embryos that do not permit their separation from the high

number of non-responsive microspores coexisting in the culture, and therefore the two types of structures had to be quantified together by LC/ESI-MSMS, which explains the low IAA concentration of these samples.

Interestingly, the IAA immunolocalization assays and the quantification of the immunofluorescence signals reveal a differential and significant increase in the IAA endogenous levels in the early multicellular embryo cells from the very initial stages of 2-3 cells; in contrast, the microspores which do not respond to the embryogenesis induction show very low IAA signal. Immunodepletion experiments of the IAA antibody with synthetic IAA show a complete absence of the immunofluorescence signal and an almost null cross-reactivity against other endogenous molecules like conjugated IAA or other IAA-related compounds, indicating that the immunolocalization assays revealed free IAA distribution. Non-responsive microspores, after the stress, show even lower IAA level than microspores before the inductive treatment, suggesting either its degradation or conjugation during the stress treatment, as well as the absence of new auxin biosynthesis in those cells that do not follow the embryogenic pathway. Other cell responses to the *in vitro* inductive stress treatment have been reported in non-responsive microspores of barley and rapeseed, such as oxidative and nitrosative stress, developmental arrest and programmed cell death (Rodríguez-Serrano et al. 2012; Satpute et al 2005), as well as a gametophytic-like development (Satpute et al. 2005; Prem et al. 2012). These non-embryogenic responses of the microspores could explain the very low levels of endogenous IAA in these microspores.

In *Arabidopsis*, auxin has been localized by the expression of the auxin-responsive promoter *DR5* in cells of the embryo proper at very early stages, from 2-cell until 8-cell stage (Möller and Weijers 2009; Robert et al. 2013); the localization of elements of the auxin biosynthetic and transport machinery in suspensor cells suggested that auxin is delivered from the suspensor to embryo at these early stages (Robert et al. 2013). In the *in vitro* system of *B. napus* microspore embryogenesis induced by heat stress studied in the present work, no suspensor is formed and IAA was localized in embryo cells from the first divisions suggesting that auxin biosynthesis is concomitantly activated with microspore reprogramming and embryogenesis initiation. Recent data have reported that the distribution of auxin depends on the temperature-inducible *in vitro* culture conditions (Dubas et al. 2014), however, in a new *in vitro* system of *B. napus* microspore embryogenesis at low temperature with the formation of suspensor-like structures, our group reported preliminary results also showing the IAA presence in cells of early multicellular embryos, being much less present in the cells of the suspensor-like structures (Prem et al. 2012), similarly to early zygotic embryogenesis. The findings of similar auxin distribution in every cell of early embryos produced from reprogrammed

microspores in culture, independently of the temperature treatment of the induction, support the idea that auxin increase is neither related to specific responses to stress nor to the temperature conditions used, but with the cell reprogramming and embryogenesis initiation. Further work will be necessary to determine whether auxin increase is a primary effect of microspore reprogramming and/or embryogenesis initiation or a secondary effect of these processes.

The low expression of the *BnNIT2* gene found in vacuolated microspores before embryogenesis induction and the significant increase of expression at the early multicellular embryo stage correlate with the increase of endogenous IAA revealed by LC/ESI-MSMS results and immunofluorescence signals, suggesting the possible participation of NITs in the auxin biosynthesis activation after the stress-induced reprogramming of the microspore, the acquisition of embryogenic competence by this totipotent cell and the initiation of microspore embryogenesis.

IAA biosynthesis is associated with rapidly dividing and rapidly growing tissues, especially in shoots and roots. In *in vitro* systems, the two phytohormones auxin and cytokinin were shown to play important roles in the induction of cell division and control of cell cycle progression, auxin starvation causing cell division arrest in suspension cell and tissue cultures of various plant species. (Himanen et al. 2002, review in Perrot-Rechenmann 2010). The stress-induced reprogramming of the microspore as totipotent cell initially leads to the activation of cell cycle and the formation of 2-cell embryos and, after subsequent divisions, multicellular embryos whose cells exhibit typical features and markers of proliferating cells (Testillano et al. 2005; Bárány et al. 2005; Solís et al. 2012; El-Tantawy et al. 2014; Rodríguez-Sanz et al. 2014). The increase of endogenous levels of IAA in early microspore-derived embryos presented here indicates that IAA biosynthesis would be involved in the proliferative activity acquired by the reprogrammed microspore and cells of the early embryo.

### **Inhibition of auxin action by PCIB impairs microspore embryogenesis progression**

During microspore embryogenesis initiation and progression, not only the endogenous IAA content and the expression of IAA biosynthesis genes highly increase, but also auxin perception and response seem to be required. We have performed treatments with the inhibitor of auxin response PCIB to address the involvement of auxin action in microspore embryogenesis; the results obtained showed that the presence of PCIB during the process greatly affects embryo development and significantly decreases the number of mature embryos produced, indicating that IAA action is required for microspore-derived embryo development progression.

### **Inhibited polar auxin transport disrupts microspore embryogenesis and affects IAA distribution pattern in embryo cells**

Studies in *Arabidopsis* roots and seedlings have reported that low concentrations of NPA (1-5  $\mu\text{M}$ ) inhibits the polar auxin flow required for establishment of embryonic apical/basal polarity and organogenesis while high concentrations ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ) of NPA also affect transport proteins and membrane trafficking in a broader sense besides the continuous cycling of PIN auxin transporters (Geldner et al. 2001; Murphy et al. 2002; Friml et al. 2003; Peer et al. 2009). In the present work on *B. napus* microspore embryogenesis cultures, NPA was applied at 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  and 40  $\mu\text{M}$  concentrations which are in the range of concentrations used for treatments to roots, seedlings and *in vitro* embryogenesis systems of different species to inhibit polar auxin transport (Esmon et al. 2006; Peer et al. 2009; Hakman et al. 2009; Larsson et al. 2012; Abrahamsson et al. 2012; Li et al. 2013). Our results showed that NPA treatments produce deleterious effects in embryo development resulting in a significant decrease in the embryogenesis yield which was similar in 3  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  NPA treatments, indicating a key role for polar auxin transport in microspore embryogenesis. Since 40  $\mu\text{M}$  NPA treatment lead to a more drastic reduction of embryo production, the possibility that high concentration of NPA could affect, besides auxin transport, protein trafficking (Peer et al. 2009) cannot be excluded. The delay in embryo development by NPA and the fact that most embryos stopped at the globular stage evidence the involvement of the polar auxin transport in microspore embryogenesis especially at the stage of the shift from radial to bilateral symmetry, the heart-torpedo embryo stage, as occurs in zygotic embryogenesis (Petrášek and Friml 2009; Prashad and Dhonukshe 2013). Also, in maize embryogenesis, primordia differentiation and scutellum development requires polar auxin transport, NPA applications strongly impaired these processes which resulted in the blocking of leaf primordia initiation and in the complete loss of normal scutellum morphology and symmetry (Forestan and Varotto 2012).

After NPA treatments, the reduced number of mature embryos produced also showed differences in some morphological features and larger size than embryos developed in control cultures, defects that were not found after PCIB treatments. Interestingly, several developmental aberrations and defects were reported under NPA and PCIB treatments applied to developing zygotic embryos of different species, like carrot and *Brassica juncea* (Hadfi et al. 1998). In *B. juncea*, fused and collar cotyledon, shorter embryo axis and thicker embryo shape were found the most frequent defects induced by NPA (Hadfi et al. 1998), similar to the results presented here in NPA-treated *B. napus* microspore embryos, which are probably related to the inhibition of establishment of auxin gradients. However these morphological changes were not observed in PCIB-treated microspore cultures; reduction of auxin activity from the beginning of embryogenesis in any embryo cell would

mainly affect embryo growth and differentiation, impairing its progression and decreasing the number of embryos that finish/complete the developmental program. In contrast, auxin transport inhibition by NPA mainly affects differential auxin distribution and gradients producing defective patterning and aberrant morphologies, as found in our results.

The IAA immunolocalization results show that NPA treatments change the auxin distribution patterns in treated embryos in comparison with controls, supporting that the effects of the NPA treatments in this system at the concentrations used are relevant to auxin transport. The change of IAA distribution patterns after NPA treatment demonstrates the involvement of IAA transport in the establishment of local auxin accumulations in developing microspore-derived embryos. Interestingly, the inhibition of polar auxin transport by NPA produced changes in the intracellular IAA distribution. The observations in early embryo cells of small cytoplasmic spots of IAA concentrations suggest the accumulation of auxin in subcellular compartments. Together with the accepted view of the intercellular auxin transport mechanism through plasma membrane carriers (Prasad and Dhonukshe 2013), other hypothesis have proposed a secreting auxin pathway via endocytic vesicle recycling (Schlicht et al. 2006; Baluška et al 2010; Nishimura et al. 2011; Baluška and Mancuso 2013). Also, it has been recently proposed a model for an alternative mechanism of polar auxine transport involving intracellular auxin retention and switch-like release from the endoplasmic reticulum (Wabnik et al. 2011) mediated by the ER-localized PIN5 transporters (Mravec et al. 2009). Our observation of IAA accumulations into small cytoplasmic compartments in embryo cells with inhibited polar auxin transport by NPA could support the existence of auxin intracellular compartmentalization. Visualization at the confocal microscopy level did not provide the resolution required to discriminate in which structural subcompartment, secretory pathway, ER and/or others, auxin is localized. In *Arabidopsis* seedlings, it has been shown that high concentrations of NPA alter protein trafficking by inhibition of APM1, an M1 aminopeptidase membrane protein which associates with brefeldine A-sensitive endomembrane structures and the plasma membrane in root cells (Peer et al. 2009), but no data on the presence of homologous proteins in *B. napus* are available. Anyway, independently of the precise molecular mechanisms of NPA at high concentration in microspore embryo cells, our observations suggest that auxin transport pathways involving its intracellular compartmentalization could operate in stress-induced microspore embryogenesis of *B. napus*.

## CONCLUSIONS

In summary, the results presented illustrate for the first time the role and dynamics of auxin during microspore embryogenesis and reveal that endogenous auxin increases after microspore embryogenesis induction, accompanying the first embryogenic divisions of the microspore in culture, indicating the activation of IAA biosynthesis after stress-induced reprogramming of the microspore and embryogenesis initiation. Taken together, results indicate that endogenous auxin biosynthesis, action and transport are involved in microspore embryogenesis initiation and development, giving new insights into the role of auxin in this *in vitro* embryogenesis process which initiates from an reprogrammed individual cell, the microspore, which acquire totipotent capacity and mimics zygotic embryogenesis, finally regenerating a plant. This information will be useful to increase our knowledge on the regulatory mechanisms of *in vitro* embryogenesis induction, opening the door to identify novel strategies and selective targets for improving the efficiency of the process in biotechnology and agronomic breeding programs.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Work supported by projects granted by the Spanish Ministry of Economy and Competitivity, MINECO (BFU2011-23752) and National Research Council, CSIC (PIE 201020E038). HRS is recipient of a predoctoral FPI fellowship (BES-2009-014245) of the Spanish MINECO.

**PUBLICACION III:**

**Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak, *Quercus suber* L.**

Referencia:

**Rodríguez-Sanz, H.**, Manzanera, J.A., Solís, M.T., Gómez-Garay, A., Pintos, B., Risueño, M.C., Testillano, P.S.: (2014) Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak, *Quercus suber* L. ***BMC Plant Biology* 14:224**





### Resumen de la PUBLICACIÓN III:

#### **Marcadores tempranos presentes en dos rutas embriogénicas, de microsporas y de embriones cigóticos inmaduros en alcornoque *Quercus suber* L.**

El alcornoque, *Quercus suber*, es un árbol forestal de clima mediterráneo con un gran interés económico y social. En esta especie se han desarrollado sistemas de embriogénesis *in vitro* a partir de microsporas para la producción rápida de líneas isogénicas y a partir de embriones cigóticos para la propagación clonal de genotipos de élite. A pesar del alto potencial de estos sistemas *in vitro* en los programas de mejora de las especies arbóreas, debido a su recalcitrancia la eficiencia de la embriogénesis *in vitro* en muchas especies leñosas es muy baja, en parte debido a que muchos de los factores responsables de la iniciación de embriogénesis y del desarrollo del embrión están todavía por descubrir. Así mismo, la búsqueda de marcadores moleculares y celulares durante las etapas tempranas de la embriogénesis *in vitro* constituye una importante aproximación que permite distinguir las células que responden al estímulo inductor, embriogénicas, de las que no lo hacen, no embriogénicas, también para dilucidar los factores implicados en la iniciación de la embriogénesis lo que permitiría una manipulación más eficiente del proceso con fines biotecnológicos.

En este trabajo, se ha realizado un análisis comparativo de dos rutas embriogénicas *in vitro*, derivadas de microsporas y de embriones cigóticos inmaduros en el alcornoque en etapas tempranas de la embriogénesis mediante un abordaje multidisciplinar, para caracterizar marcadores tempranos de las células reprogramadas a embriogénesis en ambas rutas. Para ello, se han estudiado los cambios en la organización estructural de la célula, marcas epigenéticas, auxina endógena y polímeros de pared celular en los dos sistemas.

Los resultados de este trabajo nos muestran que las células de los embriones tempranos presentan cambios definidos que son similares en ambas rutas embriogénicas *in vitro* características celulares que no presentan las células no embriogénicas. Los bajos niveles de metilación del DNA y su patrón de distribución nuclear, los elevados niveles de auxina endógena y la alta proporción de pectinas esterificadas en la pared celular encontrados en las células del embrión son claramente distintos a los observados en las microsporas y las células del embrión cigótico, antes de la inducción embriogénica por lo que estos cambios celulares constituyen marcadores tempranos de embriogénesis.

Estos resultados indican por tanto que las modificaciones epigenéticas, los cambios en los niveles de auxina endógena y la remodelación de la pared celular están implicados en la iniciación de la

embriogénesis *in vitro* en especies arbóreas, proporcionando nuevas evidencias de la similitud en el patrón de desarrollo de ambas rutas embriogénicas, de microsporas y somática de embrión cigótico, en especies leñosas.

### **Publicación III:**

## **EARLY MARKERS ARE PRESENT IN BOTH EMBRYOGENESIS PATHWAYS FROM MICROSPORES AND IMMATURE ZYGOTIC EMBRYOS IN CORK OAK, *Quercus suber* L.**

### **ABSTRACT**

In *Quercus suber*, cork oak, a Mediterranean forest tree of economic and social interest, rapid production of isogenic lines and clonal propagation of elite genotypes have been achieved by developing *in vitro* embryogenesis from microspores and zygotic embryos respectively. Despite its high potential in tree breeding strategies, due to their recalcitrancy, the efficiency of embryogenesis *in vitro* systems in many woody species is still very low since factors responsible for embryogenesis initiation and embryo development are still largely unknown. The search for molecular and cellular markers during early stages of *in vitro* embryogenesis constitutes an important goal to distinguish, after induction, responsive from non-responsive cells, and to elucidate the mechanisms involved in embryogenesis initiation for their efficient manipulation. In this work, we have performed a comparative analysis of two embryogenesis pathways derived from microspores and immature zygotic embryos in cork oak in order to characterize early markers of reprogrammed cells in both pathways. Rearrangements of the cell structural organization, changes in epigenetic marks, cell wall polymers modifications and endogenous auxin changes were analyzed at early embryogenesis stages of the two *in vitro* systems by a multidisciplinary approach.

Results showed that early embryo cells exhibited defined changes of cell components which were similar in both embryogenesis *in vitro* systems, cellular features that were not found in non-embryogenic cells. DNA methylation level and nuclear pattern, proportion of esterified pectins in cell walls, and endogenous auxin levels were different in embryo cells in comparison with microspores and immature zygotic embryo cells from which embryos originated, constituting early embryogenesis markers.

These findings suggest that DNA hypomethylation, cell wall remodeling by pectin esterification and auxin increase are involved in early *in vitro* embryogenesis in woody species, , providing new evidences of the developmental pattern similarity between both embryogenesis pathways, from microspores and immature zygotic embryos, in woody species.

**Key words:**

Somatic embryogenesis, microspore embryogenesis, anther culture, DNA methylation, 5 methyl-deoxy-cytidine, pectin esterification, cell wall, auxin, IAA.

**BACKGROUND**

*In vitro* embryogenesis systems constitute important tools for investigating the regulating mechanisms of embryo formation, as well as for biotechnological applications in plant breeding, propagation and conservation strategies. Two different embryogenesis pathways, from microspores and immature zygotic embryos, have been developed in many species for rapid production of isogenic lines and clonal propagation of elite genotypes respectively. Tree breeding strategies have focused on ways to reduce cycle time and improve the efficiency of selection; here, propagation of selected trees by somatic embryogenesis and genetic engineering approaches applied to haploids and double-haploid plants produced in short-times by *in vitro* microspore embryogenesis have a high potential. Nevertheless, due to their recalcitrance, the efficiency of embryogenesis *in vitro* systems in many woody species is still very low.

*Quercus* trees, oaks, are woody species of relevant economic and ecological interest; among them the cork oak, *Q. suber*, is a species of high social and economic relevance in the Mediterranean area as the natural source of cork. Different *in vitro* embryogenesis systems have been developed for *Quercus* spp. with variable efficiency (Vietez et al. 2009; Corredoira et al. 2014; Corredoira et al. 2012). Despite the work performed in the last decades, factors responsible for embryogenesis initiation and embryo development in established cultures are still largely unknown.

The search for molecular and cellular markers during early stages of *in vitro* embryogenesis constitutes an important goal in the identification of cells committed to the embryogenesis developmental program as opposed to those cells which are non-responsive to the embryogenic pathway, as well as in the elucidation of the cellular mechanisms underlying *in vitro* embryo progression. Changes in various cell activities and in the structural organization of subcellular compartments have been reported as accompanying the microspore reprogramming process in some herbaceous and woody species (Testillano et al. 2000, 2002, 2005; Bueno et al. 2003; Ramírez et al. 2004; Bárány et al. 2005; Solís et al. 2008; Seguí-Simarro et al. 2011). Increasing evidences have indicated the relevance of some cell features like epigenetic marks (Costa et al. 2007; Arnholdt-Schmitt et al. 2004; Solís et al. 2012; El-Tantawy et al. 2014), cell wall components (Costa et al. 2007; Fortes et al. 2002; Bárány et al. 2010a; Bárány et al. 2010b; El-Tantawy et al. 2013) and hormones (Bárány et al. 2005) in the progression of *in vitro* organogenesis and embryogenesis in

other systems, but no reports about the dynamics of these three cellular markers during *in vitro* early embryogenesis are available in two somatic embryogenesis pathways of the same species.

Dynamic changes between chromatin states are relevant in the transcriptional regulation during microspore development and reprogramming to embryogenesis (Testillano et al. 2005) and epigenetic mechanisms play an essential role in the process of cellular differentiation allowing cells to be reprogrammed in order to generate new differentiation pathways (Costa et al. 2007). DNA methylation constitutes a prominent epigenetic modification of the chromatin fiber, which becomes locked in a transcriptionally inactive conformation, thus leading to gene silencing. Stress-induced plant cell reprogramming involves changes in global genome organization, being the epigenetic modifications key factors of genome flexibility (Arnholdt-Schmitt et al. 2004). Previous studies have shown changes in DNA methylation levels and distribution patterns during microspore embryogenesis of *Brassica napus* and *Hordeum vulgare* (Solís et al. 2012; El-Tantawy et al. 2014), suggesting the existence of an epigenetic reprogramming after microspore induction to embryogenesis, but no information is available on DNA methylation dynamics during *in vitro* embryogenesis in trees.

Many of the molecular markers of *in vitro* embryogenesis and organogenesis have been found in cell walls (Solís et al. 2008; Fortes et al. 2002; Bárány et al. 2010a; 2010b; El-Tantawy et al. 2013). Pectins are the major matrix components of dicotyledonous cell walls. Pectins are polymerized and methyl-esterified in the Golgi, and secreted into the wall as highly methylesterified forms. Subsequently, they can be modified by pectin methylesterases, which catalyse the demethylesterification of homogalacturonans domains of pectins. The relationship between the esterified and the non-esterified pectins, and their distribution in the plant cell walls is the result of different processes (Goldberg et al. 1986; Dolan et al. 1997; Guillemin et al. 2005) and their proportion and dynamics are involved in many plant developmental processes. Changes in the distribution of pectins have been reported in young embryos generated from microspores of *Quercus suber* L. (Ramírez et al. 2004), *Citrus clementina* (Ramírez et al. 2003) and *Olea europaea* L. (Solís et al. 2008). Abundant esterified pectins has been reported in the newly-formed walls of proliferating cells in different plant systems, like young microspore-derived embryos and root tip meristematic cells of herbaceous species (Bárány et al. 2010a, 2010b), suggesting that a high proportion of esterified pectins in walls is a marker for proliferation events while abundant low-esterified pectins correspond to low cell proliferation rates (Bárány et al. 2010a, 2010b).

The plant growth regulator (PGR) auxin, the predominant form of which is indole-3-acetic acid (IAA), is a major coordinating signal in the regulation of plant development, with key functions in many processes including embryo formation (Möller et al. 2009; Rademacher et al. 2012). Despite it is widely known the stimulating effects of the addition of exogenous PGRs, including synthetic auxins like 2,4-D, on *in vitro* embryogenesis induction (Bárány et al. 2005; Raghavan et al. 2004), little is known about endogenous levels of these regulators at the initial stages of embryogenesis. In cork oak somatic embryos, the quantification of IAA showed the highest concentration during early embryo development and decreased afterwards (García-Martin et al. 2005). Recent work has reported preliminary results showing that endogenous IAA localized in cells of early multicellular embryos developed in isolated microspore cultures of *Brassica napus* (Prem et al. 2012).

Previous reports have indicated that microspore embryogenesis mimics zygotic embryogenesis in several species (Bueno et al. 2003; Bárány et al. 2005; Solís et al. 2012; Massonneau et al. 2005). Proteomic analyses have approached the identification of protein expression patterns in *Q. suber* embryos originated by different *in vitro* systems during advanced developmental stages and maturation (Gómez-Garay et al. 2013, 2009). The phytohormones can act as signaling molecules for remodeling cell walls during cell elongation, as well as for modifying chromatin domains to activate gene expression programs. In this sense, the information about the dynamics of epigenetic marks, pectin esterification changes in walls and auxin during early embryogenesis could inform on possible correlations among these processes, giving new insights into the complex regulatory mechanisms controlling cell reprogramming and embryogenesis induction.

In the present work, we have performed a comparative analysis of *in vitro* embryogenesis of microspores and immature zygotic embryos in cork oak in order to characterize early markers of embryo cells, in contrast with non-responsive cells, in both pathways and to gain new insights into the cellular mechanisms involved in the *in vitro* embryogenesis induction in woody species, in which there is scarce information, as well as to provide new evidences of the developmental pattern similarity between both embryogenesis pathways, from microspores and zygotic embryos. We have analyzed the changes in DNA methylation, esterification of pectins in cell walls and endogenous auxin distribution, during early embryogenesis of the two *in vitro* systems.

The results presented here revealed differential features in early multicellular embryo cells constituting early embryogenic markers which are similar in both pathways originated from microspores and zygotic embryos, providing additional evidences to the developmental pattern analogy of embryogenesis pathways.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant material

Catkins and immature pollinated acorns were collected from *Quercus suber* L. trees every week during flowering period and fruit development period respectively from two selected trees in the E.T.S. de Montes (Universidad Politécnica de Madrid) and three selected trees from El Pardo, Madrid, Spain.

The branches bearing catkins were pre-treated by chilling in darkness with moist cotton at 4°C for 1 week. Catkins of different sizes were squashed and stained with DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) to visualize the nuclei and observed under fluorescence microscope to determine the developmental stage of the microspore. The selected catkins, only those red coloured and 1.5-2.5 cm long that contains the vacuolated microspore, the most responsive stage for embryogenesis induction (Pintos et al. 2005), were surface sterilized. Immature acorns selected at the appropriate developmental stage for somatic embryogenesis induction were those with small size, 1cm, and green colour; they were kept at 4°C for one week. Catkins and acorns were surface sterilized by immersion in 70% ethanol (Merck), for 1 min, and 2% sodium hypochlorite with a drop of Tween-20 for 20 min followed by three rinses in sterile distilled water for 10 min each. The anthers and the immature zygotic embryos were carefully excised from catkins and acorns respectively, isolated, dissected and cultured under aseptic conditions in a laminar flow cabinet.

For their use as controls in other plant systems, some mature anthers of *Quercus suber* were extracted directly from catkins, without any pretreatment, and fixed and processed for further use in immunofluorescence assays. Also, zygotic embryos at the torpedo stage were extracted from siliques of *Brassica napus* plants, fixed and processed for immunofluorescence.

### Culture media

Basal culture medium for both microspore and somatic embryogenesis contained full macronutrients (Sommer et al. 1975), micronutrients and cofactors (Murashige et al. 1962), 3% sucrose and was solidified with 0.8% Agar, adjusted to pH=5.6, and autoclaved. The amino acids and labile compounds were added after autoclaving by filter-sterilization (0.22 µm). Microspore embryogenesis induction medium was basal culture medium supplemented with 1% active charcoal, while somatic embryogenesis induction medium was supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D.



### ***In vitro* embryogenesis of microspores and immature zygotic embryos**

Anthers containing vacuolated microspores were isolated from the catkins and plated in Petri dishes with induction medium for microspore embryogenesis in an amount of 100 anthers per plate approximately, subjected at 32°C in darkness during 5 days (Bueno et al. 1997), and then transferred to 25°C. After one month visible embryos emerged from inside the anther. Embryos obtained were isolated and transferred to plates containing basal medium without active charcoal and supplemented with 0.5 g/L glutamine, where the embryos were propagated by secondary embryogenesis.

Immature zygotic embryos were cultured in Petri dishes containing induction media for somatic embryogenesis placing 5 embryos per plate and cultured at 25°C with 16/8 h light/darkness, for one month (Manzanera et al. 1993; Bueno et al. 1992). Then, the immature zygotic embryos were transferred to growth regulator-free medium, where new embryos and embryogenic masses, were found and suffered recurrent somatic embryogenesis process.

Every week, embryogenesis cultures, were observed under a microscope Leica MZ16FA, to monitor the embryogenesis process. Culture samples at different developmental stages of the two embryogenic systems were either fixed for microscopic analysis or frozen by immersion in liquid nitrogen for biochemical assays.

### **Treatments with NPA**

N-1-Naphthylphthalamic acid, NPA (Duchefa), auxin transport inhibitor, was added at 40 µM concentration to the corresponding media of microspore and somatic embryogenesis, using a stock of 0.1 M NPA in DMSO, after filtering with a sterile Ministart filter (Sartorius Biotech). The NPA was added to plates of propagating embryogenic masses by secondary embryogenesis, using parallel plates of the same cultures and keeping some plates lacking NPA as controls. To assess NPA effects on embryogenesis development, the embryo growth and emergency of new embryos per plate was evaluated after 20 days in NPA-treated and control cultures.

### **Antibodies**

The following antibodies and dilutions were used: anti-5-methyl-deoxy-cytidine (5mdC) mouse monoclonal diluted 1:100 (Eurogentec, Cat. N: BI-MECY-0100, Liege, Belgium), anti-IAA mouse monoclonal diluted 1:100 (Sigma, Cat. N: A 0855), JIM5 rat monoclonal (Plant Probes, Cat. N:

JIM5), and JIM7 rat monoclonal (Plant Probes, Cat N: JIM7) diluted 1:25 for immunofluorescence, and 1:100 for immunodot-blot assays.

### **Fixation and processing for immunofluorescence**

Embryogenesis culture samples from microspores and immature zygotic embryos were collected at different times and fixed overnight with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) at 4°C. For control experiments, mature anthers of *Quercus suber* and zygotic torpedo embryos of *Brassica napus* were excised from plants and fixed by the same procedure. Most samples were embedded in resins and some large samples were processed for cryostat.

#### *Processing for cryostat sectioning*

Fixed samples were washed in PBS, cryoprotected through a gradual infiltration in sucrose solutions: 0.1M, 0.5M, 1 M, 1.5M and 2M for 1h each and 2.3 M overnight, at 4°C, embedded in Tissue-Tek optimal cutting temperature (OCT) compound and frozen on dry ice for sectioning in the cryostat (Leica CM 1950). 20-30 µm thick sections were collected on glass slides, washed with water to eliminate the OCT and transferred to a water drop over 3-aminopropyl-triethoxy-silane (APTES)-coated slides, air-dried and stored at -20°C until use for immunofluorescence (IF).

#### *Processing for resin embedding and ultramicrotome sectioning*

Fixed samples were washed in PBS, dehydrated through an acetone series (30%, 50%, 70%, 90% and 100%) and embedded in Technovit 8100 resin (Kulzer, Germany) at 4°C. The blocks were sectioned at 1-2 µm thickness and stained with 1% toluidine blue for structural analysis, mounted with Eukitt and observed under bright field microscopy. Some sections were placed on APTES coated slides, air-dried, and stored at 4°C until use for immunofluorescence.

### **Immunofluorescence**

Immunofluorescence (IF) was performed essentially as previously described by us (Solís et al. 2012; El-Tantawy et al. 2013; Prem et al. 2012). For cryostat sections, permeabilization was required prior to IF. After thawing the sections at room temperature, they were dehydrated and rehydrated in a methanol series (30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 90%, 70%, 50%, 30%, 5min each) and PBS. They were subsequently subjected to enzymatic digestion of cell walls for additional permeabilization by treatment with an enzymatic mixture (2.5% pectinase, 2.5% cellulase and 2.5% pectoliase) in PBS for 45 min. Semithin resin sections did not required permeabilization and were subjected directly to the immunodetection, after incubation in PBS for a few minutes. At this step, all section types followed the same protocol of IF. Sections were first blocked with 5% Bovine Serum Albumin

(BSA) or 10% foetal calf serum (FCS) for IAA-immunofluorescence, in PBS for 10 min, and incubated for 1h with JIM5, JIM7, anti-5-methyl-deoxy-cytidine (5mdC), anti-IAA, rat and mouse monoclonal antibodies respectively. For the 5mdC antibody the sections were previously denaturated with 2N HCl for 45 min. After three rinsing steps in PBS, sections were incubated for 45 min with Alexa Fluor 488-labelled anti-rat or anti-mouse IgG antibody diluted 1:25 in BSA 1% in the dark. After washing in PBS, nuclei were stained with DAPI, washed with PBS, mounted in Mowiol and examined in a confocal microscope (Leica TCS-SP2-AOBS, Vienna, Austria). Optical sections and maximum projections images were obtained with software running in conjunction with the confocal microscope (Leica software LCS version 2.5).

Negative controls were performed as follows: for the 5mdC antibody by avoiding the denaturation step; and for the IAA antibody by immunodepletion assays; the anti-IAA antibody was incubated with a solution of 5 mg/ml synthetic IAA (1:4, v/v) at 4°C overnight. The pre-blocked antibody solution as used as primary antibodies for immunofluorescence, following the same protocol and conditions described above.

#### **Immuno dot-blot assay for JIM5 and JIM7 antibodies**

Samples from the two embryogenesis cultures were collected at different developmental stages, and frozen in liquid nitrogen. Dot-blot assays for JIM5 and JIM7 antibodies were performed as described by us (El-Tantawy et al. 2013). Samples, 0.1g for each sample, were homogenized in liquid nitrogen using a chilled mortar and pestle, with 50 ml of buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.2, 50 mM trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,-tetra-acetic acid (CDTA) and 25 mM dithiothreitol. The resulting supernatant concentrations were determined according to Bradford (Bio-Rad Protein Assay reagent) using bovine serum albumin (BSA) as calibrator and all samples were adjusted to a concentration of 0.5 mg/ml. For immuno Dot-Blot assays, 5 µl aliquots of adjusted supernatants were applied to a nitrocellulose membrane (Millipore; Bedford, MA, United Kingdom) and left to dry for 1 h. Strips were first stained for total protein detection with Ponceau red, and the images of the stained dots were captured by scanning. The membrane was incubated overnight at room temperature, with the primary antibodies (JIM5 and JIM7) diluted 1:100, in the blocking buffer (2% powdered skimmed milk containing 0.05% Tween-20 in PBS), washed, and incubated for 1 h with alkaline phosphatase-conjugated anti-rat antibody diluted 1:1.000 in the blocking solution. Finally, the epitopes recognized by the antibodies were revealed by treatment with a nitroblue tetrazolium, bromo-chloroind-olyl-phosphate (NBT-BCIP) mixture. Quantification of the relative intensity of the dot blot signals was performed by using the tool for color intensity quantification of the image analysis software Adobe Photoshop. For the

quantification, images of three replicates for each antibody, developmental stage and embryogenesis pathway were used. Values of color intensity, in arbitrary units, for each antibody were calculated and adjusted to the intensity of Ponceau S dots, which estimate the protein level. Mean values and standard deviations were calculated and the results showed in histograms. Differences among stages were tested by one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test at  $P \leq 0.05$ .

#### **Quantification of DNA methylation by 5mdC ELISA-based immunoassay**

Samples were collected from both embryogenesis culture systems, from microspores and immature zygotic embryos, at different developmental stages and frozen in liquid nitrogen. Quantification of DNA methylation was performed as previously described (Testillano et al. 2013). Total DNA was extracted of each sample from 0.1 g of frozen material, using a plant genomic DNA extraction kit (DNeasy Plant Mini, Qiagen) following the kit's instructions. The purified DNA, 100 ng of genomic DNA for each sample, was used for global DNA methylation quantification by using a MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric, Epigentek, NY) added to an ELISA plate where the methylated fraction of DNA was quantified using 5-deoxy-methyl-cytidine specific antibodies. The amount of methylated DNA was proportional to the optical density (OD) measured in an ELISA plate reader at 450 nm. By subtracting negative control readings from the readings for the sample and the standard, the value of 5-methyl-deoxy-cytosine for each sample was calculated as a ratio of sample OD relative to the standard OD. Results were expressed as the percentage of methylated deoxy-methyl-cytosines (5mdC) of total DNA. For the quantification, three replicates for each developmental stage and embryogenesis pathway were used. Mean values and standard deviations were calculated and the results showed in histograms. Differences among stages were tested by one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test at  $P \leq 0.05$ .

## RESULTS

### **Characterization of early developmental stages of embryogenesis of both microspore and zygotic embryo origins in *Quercus suber***

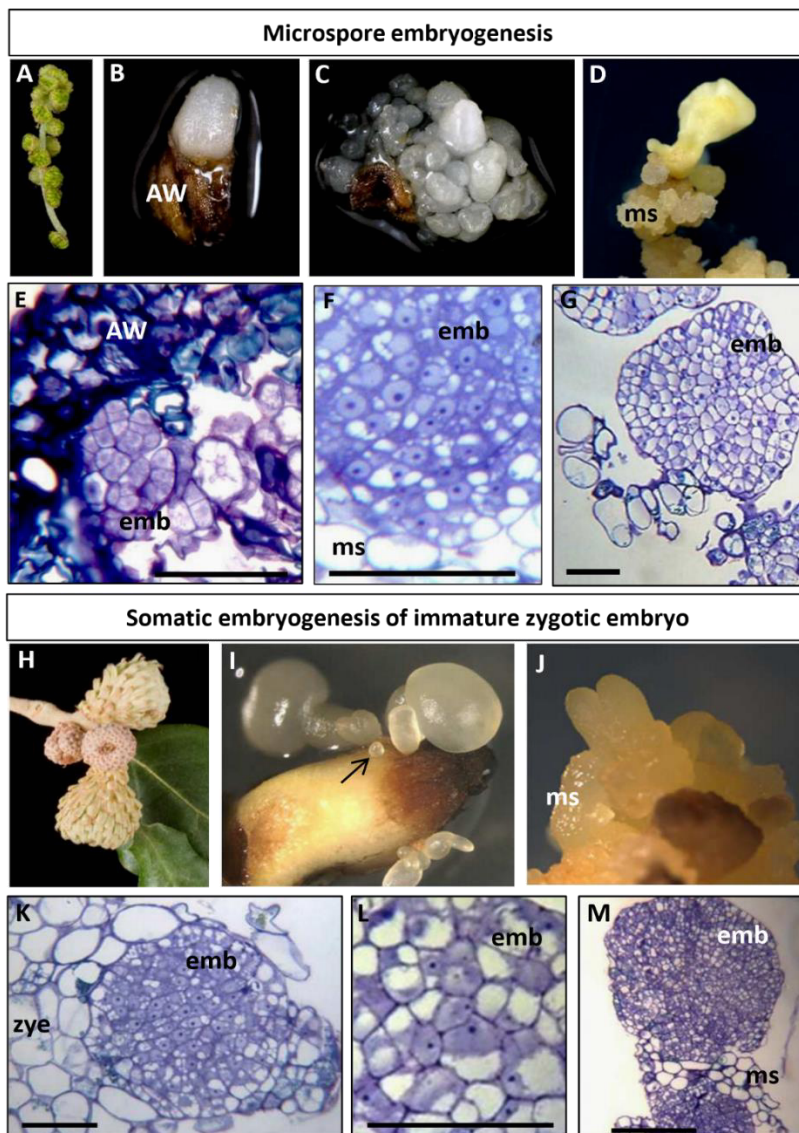
Two different embryogenic *in vitro* systems have been compared in cork oak, embryogenesis of microspores (through anther culture) and immature zygotic embryos, to analyze the presence and distribution patterns of various cellular components at early embryogenesis stages and to identify common markers present in the two embryogenic pathways at the initial stages.

Microspore embryogenesis was induced by heat treatment in anthers excised from catkins (Fig. 1A) at the developmental stage in which they contained microspores at the responsive stage of vacuolated microspores. After 20-25 days in culture, white small multicellular and globular embryos emerged from inside the anther (Fig. 1B, C); these embryos further developed to heart, torpedo and cotyledonary embryos. Mature cotyledonary embryos produced by microspore embryogenesis were subcultured monthly on medium without growth regulators producing embryogenic masses (“ms” in Fig. 1 D) from which new embryos emerged by secondary embryogenesis (arrow in Fig. 1D).

Microscopic analysis of culture samples at early developmental stages showed small multicellular embryos (“emb” in Fig. 1E) of different sizes inside the anthers and emerging out of the them. The early multicellular embryos originated by either direct or secondary embryogenesis showed a typical structural organization consisting in a more or less rounded structure formed by small cells, with characteristic features of active proliferating cells. The cells of these so-called early multicellular embryos were small, with medium-large nucleus, slightly dense cytoplasm and low vacuolation (“emb” in Figs. 1E, F, G), very different from the cells of the anther wall tissues (“AW” in Fig. 1E) and embryogenic masses (“ms” in Fig. 1F, G) which were of larger size and highly vacuolated. .

Immature pollinated acorns (Fig. 1H) were the source of zygotic embryos which were cultured and used for somatic embryogenesis induction. Around one month after the culture initiation, early multicellular embryos of various sizes and globular embryos were observed on the surface of the immature zygotic embryos, they later developed to produce heart, torpedo and cotyledonary embryos (Fig. 1I). Embryos were transferred to proliferating medium where secondary embryogenesis was observed and after repetitive subcultures the existing embryos could proliferate

by producing embryogenic masses (“ms” in Fig. 1J) from which new embryos were originated (arrow in Fig. 1J).



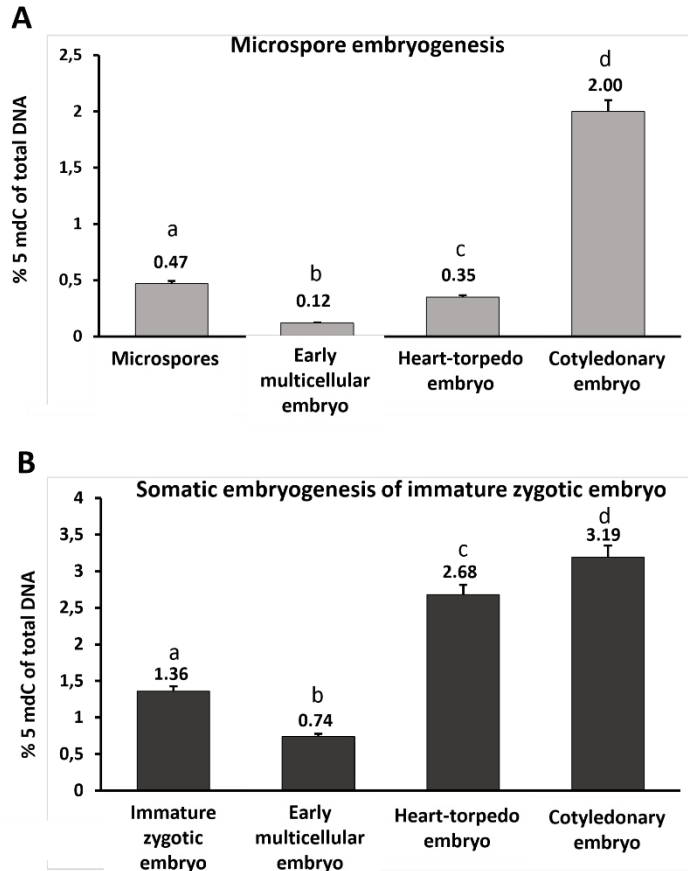
**Figure 1: Main developmental stages of *in vitro* embryogenesis in cork oak.** **A-G:** Microspore embryogenesis. **H-M:** Somatic embryogenesis of immature zygotic embryos. **A-D, H-J:** Explants and *in vitro* embryo development. **E-G, K-M:** Different stages of embryo development, resin sections stained by toluidine blue. **A:** Catkin selected for *in vitro* microspore embryogenesis. **B, C:** Multicellular and globular embryos (white structures) of different sizes emerging from inside anthers (AW, anther wall) after 20-30 days in culture. **D:** Secondary embryo (white arrow) emerging from embryogenic masses (ms). **E:** Early multicellular embryos (emb) formed inside the anther and surrounded by the tissue of the anther wall (AW). **F:** Cells of an early multicellular embryo at higher magnification. **G:** Large multicellular embryo formed by secondary embryogenesis attached to some cells of an embryogenic mass (ms). **H:** Acorn selected for *in vitro* somatic embryogenesis of immature zygotic embryos. **I:** Embryos of different developmental stages and sizes emerging from the immature zygotic embryo explant after 30 days in culture, early multicellular embryo (black thin arrow), globular, heart (white thick arrow) and cotyledonary (white open arrow) embryos. **J:** Secondary embryo (white arrow) at the torpedo stage originated from embryogenic masses (ms). **K:** Early multicellular embryo (emb) formed at the surface of an immature zygotic embryo (zye). **L:** Cells of an early multicellular embryo at higher magnification. **M:** Early multicellular embryos (emb) formed by secondary embryogenesis and emerging from inside an embryogenic mass (ms). Bars: **A, H:** 100  $\mu$ m; **B, C, D, I, J:** 1 mm; **E, F, G, K, L:** 50  $\mu$ m; **M:** 200  $\mu$ m.

The cells of early multicellular embryos of this somatic embryogenesis system showed a similar structural organization than those of the microspore embryogenesis pathway, early embryo cells exhibited small size, dense cytoplasm with small vacuoles and a mid-size nucleus (“emb” in Figs. 1K, L), clearly distinguishable from the larger cells displayed by the immature zygotic embryo which exhibited a large vacuole (“zye” in Fig. 1K). Secondary embryos of microspore and somatic origin emerged and developed from the embryogenic masses as small multicellular embryos (“emb” in Fig. 1M) formed by cells which exhibited similar organization than described for cells of early multicellular embryos directly originated from microspores or immature zygotic embryos, very different than the larger and highly vacuolated cells of the embryogenic masses (“ms” in Fig. 1M).

### **DNA methylation changes during early embryogenesis of both microspore and zygotic embryo origins**

The percentage of global DNA methylation was analyzed at different developmental stages of embryogenesis as well as in microspores and zygotic embryos (Fig. 2). The results of the quantification showed similar temporal DNA methylation profiles in both embryogenesis pathways. DNA methylation significantly decreased ( $p \leq 0.05$ ) after embryogenesis induction, in early multicellular embryos, in comparison with microspores in anthers, and zygotic embryos before embryogenesis initiation. At later embryogenesis stages DNA methylation levels significantly increased ( $p \leq 0.05$ ) in heart and torpedo embryos, and during late embryo development, reaching the highest level in cotyledonary embryos in the two *in vitro* systems (Fig. 2). In heart-torpedo embryos of the second pathway, derived from zygotic embryos, the increase in global DNA methylation was higher than in the microspore embryogenesis pathway.

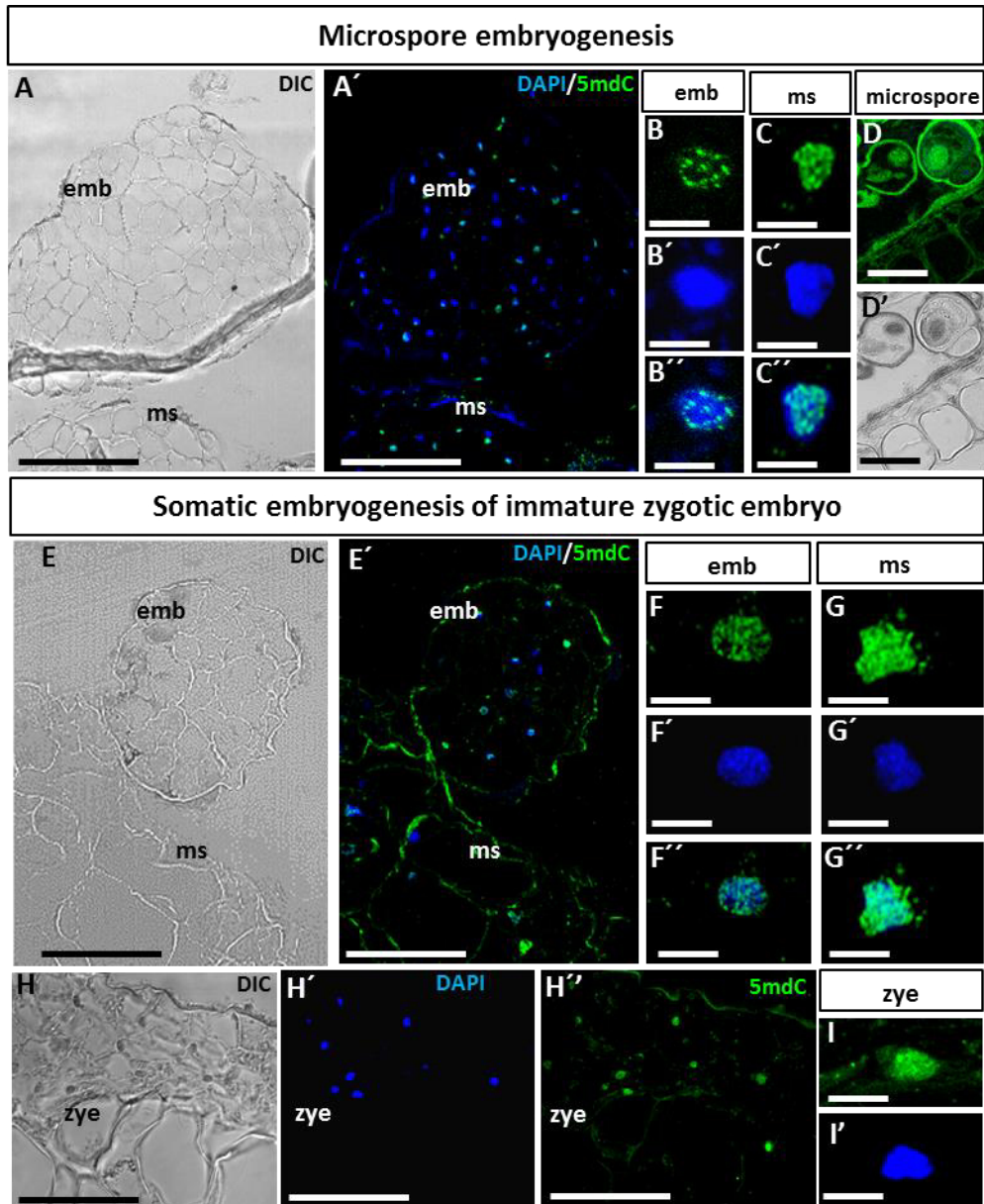
To analyze the changes in the nuclear distribution pattern of methylated DNA during early embryogenesis, immunofluorescence with anti-5mdC antibody followed by confocal analysis was performed at early stages of both primary and secondary embryogenesis, specifically at the stage of early multicellular embryos in the two pathways studied, microspores and immature zygotic embryos. The 5mdC immunofluorescence signal was similar in early multicellular embryo cells of the two embryogenesis pathways (Fig. 3) and in primary and secondary embryos. The 5mdC immunofluorescence signal was very different in early embryo cells than in microspores of anthers (Fig. 3D, D’), immature zygotic embryos (“zye” in Fig. 3H, H’, H’’, I, I’) and embryogenic masses (“ms” in Fig. 3A, A’, C, C’, C’’, E, E’, G, G’, G’’). Early multicellular embryos directly originated from *in vitro* microspore or zygotic embryo cultures by primary embryogenesis showed the same 5mdC pattern of localization than multicellular embryos (“emb” in Fig. 3A, A’, E, E’) produced from embryogenic masses (“ms” in Fig. 3A, A’, E, E’) by secondary embryogenesis in the two pathways.



**Figure 2: Global DNA methylation during *in vitro* embryogenesis of microspore and immature zygotic embryo.** Histograms representing the mean values of 5mdC percentage of total DNA in different stages of microspore embryogenesis (A) and somatic embryogenesis of immature zygotic embryos (B), quantified by ELISA-based immunoassay. Bars on columns represent the standard errors of the means. Different letters on columns indicate significant differences according to ANOVA and Tukey's test at  $P \leq 0.05$ .

Early embryo cells displayed a distribution pattern of 5mdC immunofluorescence in small bright spots over the nucleus, which were clearly identified by DAPI staining (Fig. 3, B, B', B'', F, F', F''), these 5mdC fluorescence spots probably correspond to small heterochromatin masses. On the contrary, nuclei of microspores (Fig. 3 D, D'), immature zygotic embryos ("zye" in Fig. 3H, H', H'', I, I') and embryogenic masses (Fig. 3C, C', C'', G, G', G'') showed an intense 5mdC immunofluorescence signal which covered almost the entire nuclear region. The exine, the special pollen wall, showed unspecific autofluorescence (Fig. 3D) which did not interfere with the specific immunofluorescence signals detected throughout the microspore embryogenesis analysis. Control experiments avoiding the first antibody or the denaturation step, required for 5mdC recognition by the antibody, did not show labeling in any sample and developmental stage, assessing the specificity of the antibody.





**Figure 3: Methylated DNA nuclear patterns at early *in vitro* embryogenesis of microspore and immature zygotic embryo.** A-D: Microspore embryogenesis. E-I: Somatic embryogenesis of immature zygotic embryos. A, A', E, E': Confocal images of 5mdC immunofluorescence in early multicellular embryos (emb) and embryogenic masses (ms). Differential interference contrast, DIC, images (A, E), and merged images of 5mdC immunofluorescence (green) and DAPI staining (blue) for the nuclei (A', E') of the same sections. B-B'', C-C'', F-F'', G-G'': High magnification images of representative nuclei of early multicellular embryos, "emb" (B-B'', F-F''), embryogenic masses, "ms" (C-C'', G-G''), microspores (D, D') and immature zygotic embryos, "zye" (I, I') showing 5mdC immunofluorescence in green (B, C, D, F, G, I), DAPI staining of nuclei in blue (B', C', F', G', I') and merged images of both green and blue channels (B'', C'', F'', G''). Bars: A, A', E, E': 50  $\mu$ m; B, B', B'', C, C', C'', F, F', F'', G, G', G'', I, I': 5  $\mu$ m; D, D': 10  $\mu$ m.

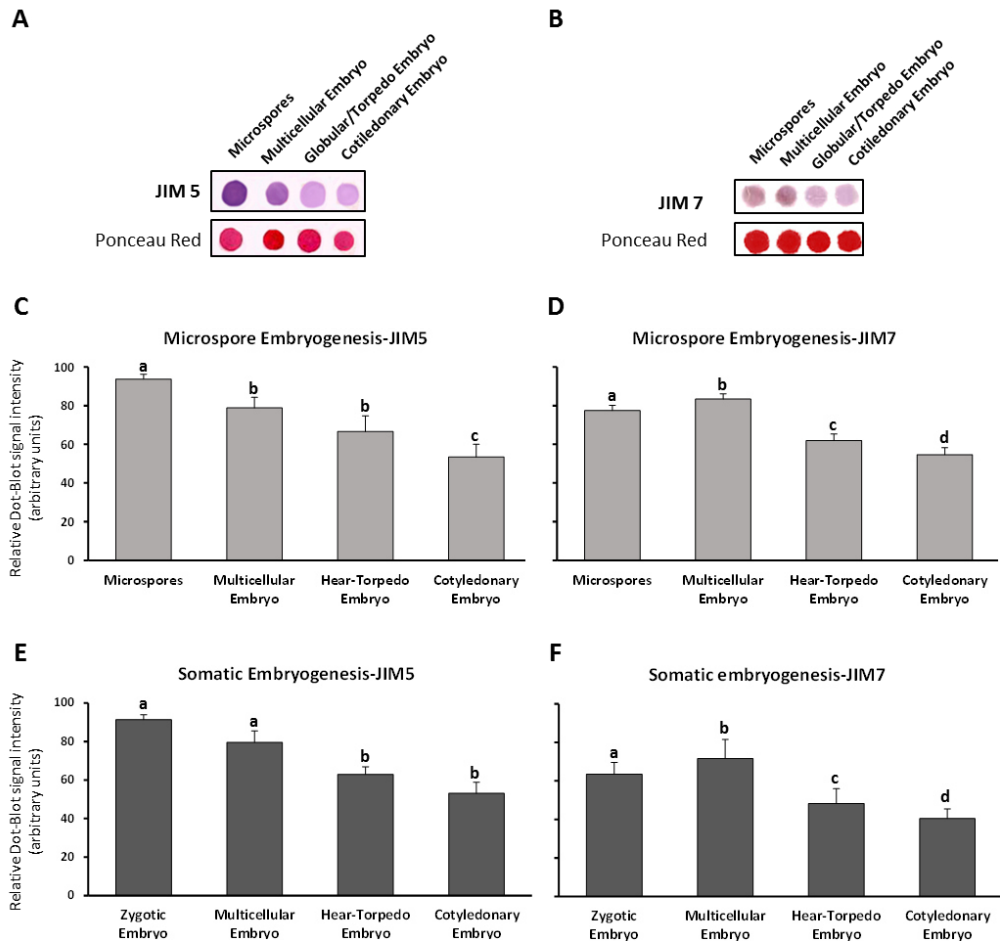
### **Changes in pectin esterification of cell walls during early embryogenesis of both microspore and zygotic embryo origins**

The changes in the proportion of pectin esterification in the cell walls during early stages of embryogenesis of microspore and zygotic embryos were analyzed by using JIM5 and JIM7 specific antibodies, which recognize non-esterified and highly-esterified pectins respectively, in immunodot-blot and immunofluorescence assays. Dot-blot analysis was performed in microspores and zygotic embryos before embryogenesis induction as well as in embryos during consecutive developmental stages of both embryogenic pathways. The differences in the signal intensities of dot-blot, which were performed over equal amounts of protein extracts, as illustrated by the Ponceau red staining, revealed changes in the proportion of highly-esterified and non-esterified pectins of cell walls during embryogenesis (Fig. 4A, B). The quantification of the signal intensities showed similar temporal profiles in the two embryogenesis pathways for each antibody (Fig. 4C, D, E, F). JIM5 signal, corresponding to non-esterified pectins, was high in microspores and zygotic embryos before induction whereas it progressively diminished with embryogenesis progression in heart, torpedo and cotyledonary embryos (Fig. 4C, E); in the microspore embryogenesis pathway, the lowering of JIM5 signal was significant also at earlier stages, in multicellular embryos (Fig. 4C, E). On the contrary, JIM7 antibody which recognizes highly-esterified pectins, showed a significant signal increase ( $p \leq 0.05$ ) in early multicellular embryos in comparison with microspores and immature zygotic embryos (Fig. 4D, F). The intensities of JIM7 signals at advanced embryogenesis stages progressively decreased, in heart, torpedo and cotyledonary embryos (Fig. 4D, F). Control experiments avoiding the first antibodies did not show labeling in any case.

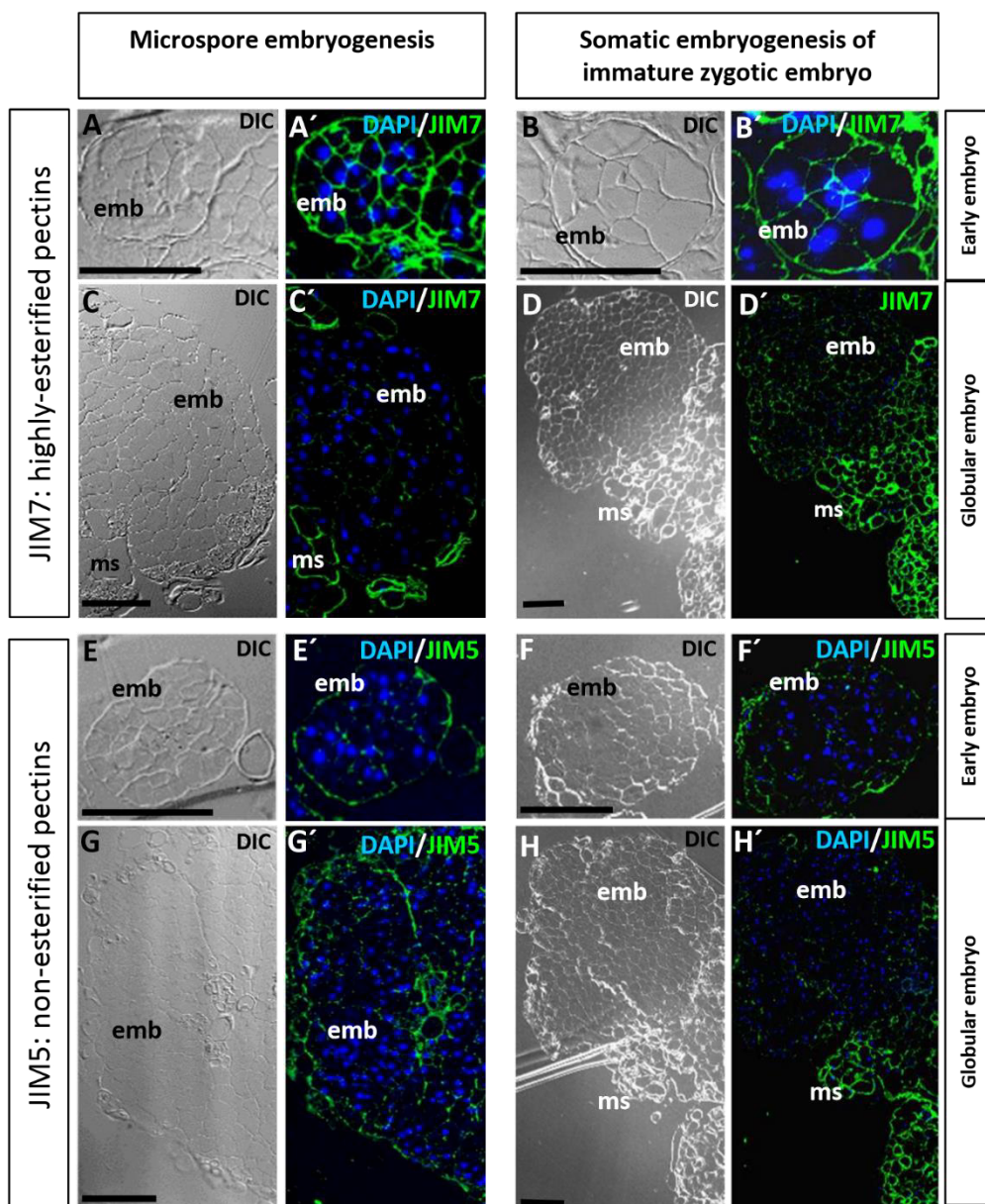
Immunofluorescence assays revealed analogous localization patterns in both embryogenesis pathways from microspore and immature zygotic embryos for each pectin epitope, non-esterified (JIM5 labelling) and highly-esterified (JIM7 labelling) pectins. JIM7 labelling was intense on peripheral and inner cell walls of early multicellular embryos (“emb” in Fig. 5A, A', B, B').

In contrast, early multicellular embryos showed very low or no labeling with JIM5 antibody on inner cell walls, only the peripheral wall layer surrounding the multicellular embryos exhibited JIM5 labelling (Fig. 5E, E', F, F'). At more advanced developmental stages, globular embryos developed by direct and secondary embryogenesis showed very low or no labeling with JIM7 or JIM5 antibodies, whereas cell walls of embryogenic masses appeared labeled with both antibodies (“ms” in Fig. 5C, C', D, D', H, H'). The fact that the results of the dot-blot assays showed faint positive JIM5 and JIM7 signals on advanced embryo stages indicated a higher sensitivity of this assay in comparison with immunofluorescence on resin sections where only epitopes exposed on the section surface can be detected; on the other hand, the possibility that some cells of the

embryogenic masses would remain attached to embryos in the samples used for dot-blot assays and slightly contribute to dot-blot signals, cannot be completely excluded.



**Figure 4: Distribution patterns of non-esterified (JIM5) and highly-esterified (JIM7) pectins during *in vitro* embryogenesis of microspore and zygotic embryo origins.** A, B: Representative immuno dot-blot assays of JIM5 (A) and JIM7 (B) at different developmental stages of microspore embryogenesis. Ponceau Red staining for total proteins and immuno-dot-blot of the same strip is shown for each antibody. C-F: Histograms representing the mean values of dot color intensities in arbitrary units of JIM5 (C, E) and JIM7 (D, F) during microspore embryogenesis (C, D) and somatic embryogenesis of immature zygotic embryos (E, F). Bars on columns indicate standard errors of the means. Different letters on columns indicate significant differences according to ANOVA and Tukey's test at  $P \leq 0.05$ .



**Figure 5: Immunolocalization of non-esterified (JIM5) and highly-esterified (JIM7) pectins at early *in vitro* embryogenesis of microspore and immature zygotic embryos.** A, A', C, C', E, E', G, G': Microspore embryogenesis. B, B', D, D', F, F', H, H': Somatic embryogenesis of immature zygotic embryos. A'-H': Confocal merged images of immunofluorescence signal (green) of JIM7 (A'-D') or JIM5 (E'-H') combined with DAPI staining of nuclei (blue). A-H: Differential interference contrast, DIC, images of the same sections. A, A', B, B', E, E', F, F': Early multicellular embryos. C, C', D, D', G, G', H, H': Large multicellular and globular embryos (emb) emerging from embryogenic masses (ms) by secondary embryogenesis. Bars: 100  $\mu$ m.

### **Localization of endogenous auxin during early embryogenesis of both microspore and zygotic embryo origins**

The localization of the endogenous auxin indol acetic acid, IAA, was approached by immunofluorescence assays using specific anti-IAA antibodies. Results showed similar patterns of IAA localization in the two embryogenesis pathways, from microspores and from zygotic embryos. After embryogenesis induction, very low or no IAA labeling was observed in microspores (Fig. 6A, D) and immature zygotic embryos (“zye” in Fig. 6G, J) in culture. In microspores, the special pollen wall, the exine, showed unspecific autofluorescence (Fig. 6D). However, an intense IAA labeling was found in the cytoplasm of cells of early multicellular embryos produced in the two pathways by primary embryogenesis (“emb” in Fig. 6B, E, H, K) B, F). During early secondary embryogenesis, at the surface of the embryogenic masses (“ms” in Fig. 6C, F, I, L) the dense cells which originate new multicellular embryos, also showed intense IAA labeling (arrows in Fig. 6C, F, I, L), whereas the subjacent embryogenic mass cells (“ms” in Fig. 6C, F, I, L) did not show any labeling. Controls by immunodepletion of the IAA antibody did not show labeling in any cellular structure and developmental stage, supporting the specificity of the immunofluorescence results.

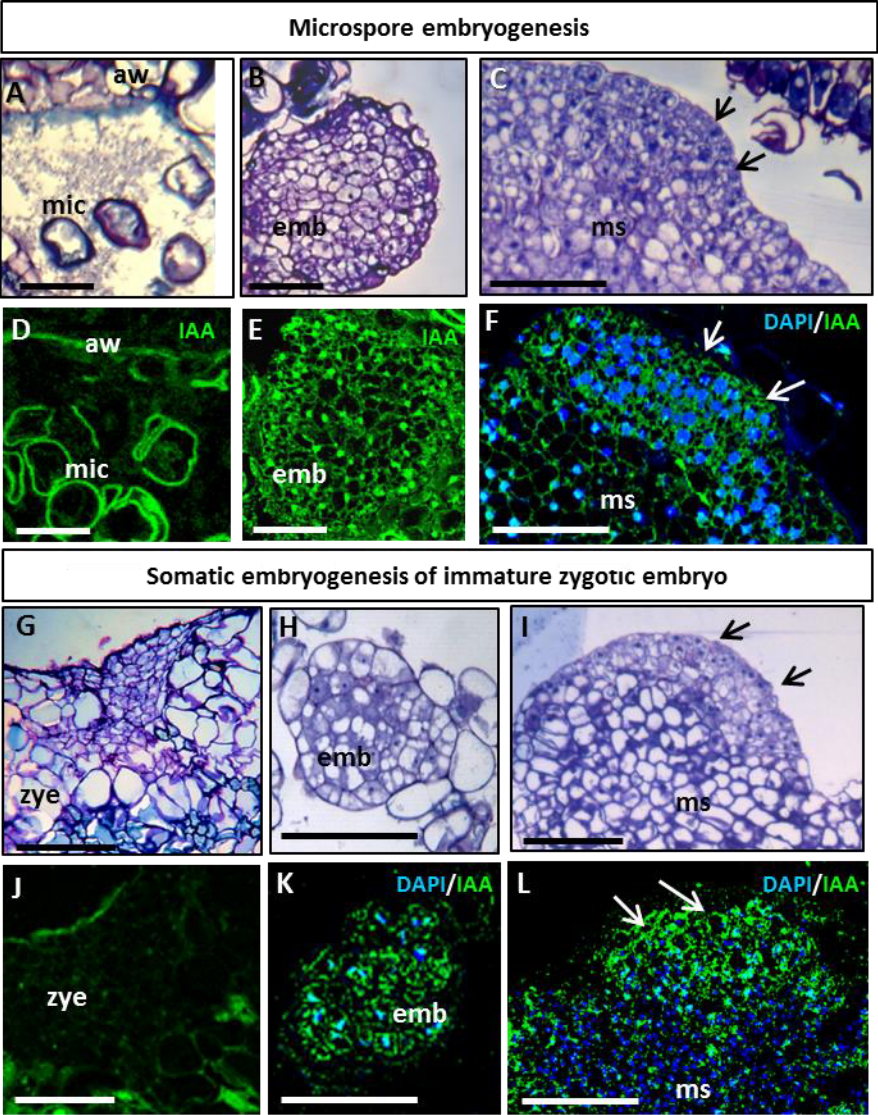
To assess the involvement of endogenous auxin accumulations in the early stages of embryogenesis of the two pathways, treatments with the inhibitor of the polar auxin transport 1-N-naphthylphthalamic acid (NPA) were performed to *in vitro* cultures with embryogenic masses originated from the two systems. Results were similar in embryogenic cultures of both origins microspore and immature zygotic embryos; they showed that NPA treatment affected embryo development in comparison with control cultures (Fig. 7). After 20 days of NPA treatment, neither new embryos nor development of the embryogenic masses were observed on treated cultures, whereas in parallel embryogenic cultures without NPA embryogenesis normally initiated and progressed. New embryos emerging from the embryogenic masses and development of previous embryos were observed at the same time period (Fig. 7).

### **Distribution patterns of the cellular markers used (methylated DNA, highly-esterified and non-esterified pectins, and auxin) in other developmental systems with proliferating and differentiated cells**

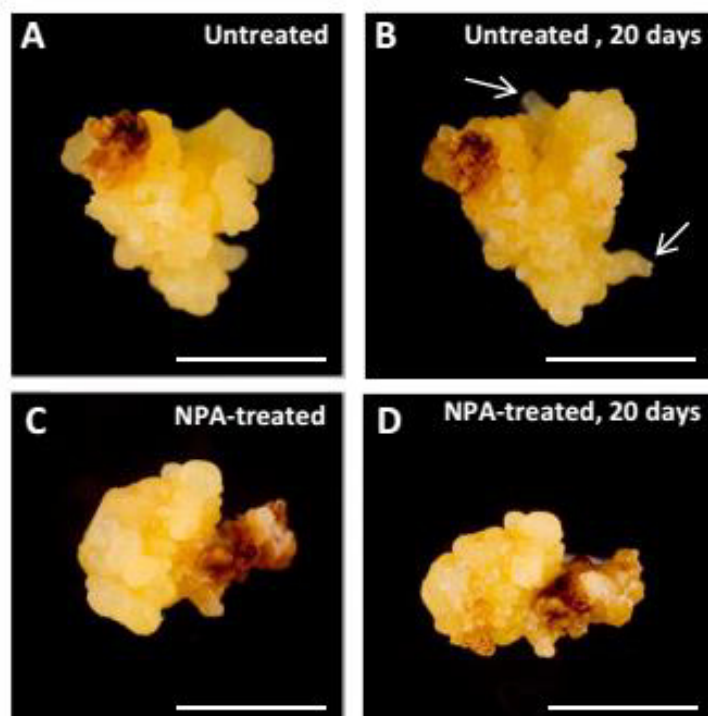
In order to evaluate the patterns of the selected cellular features (5mdC, highly-esterified and non-esterified pectins, and IAA) as early markers of embryogenesis, their distribution was analyzed in other two plant developmental systems with proliferating and differentiated cells, taken as positive and negative controls. One system was the proliferating cells of developing zygotic embryos in which the markers should be found, and in a different plant species, *Brassica napus*, to additionally



evaluate whether those features were also present in other species. The other system was a non-embryogenic system with differentiated cells, the epidermis and subjacent cell layers of mature anthers, differentiated tissues where the markers should not be present.

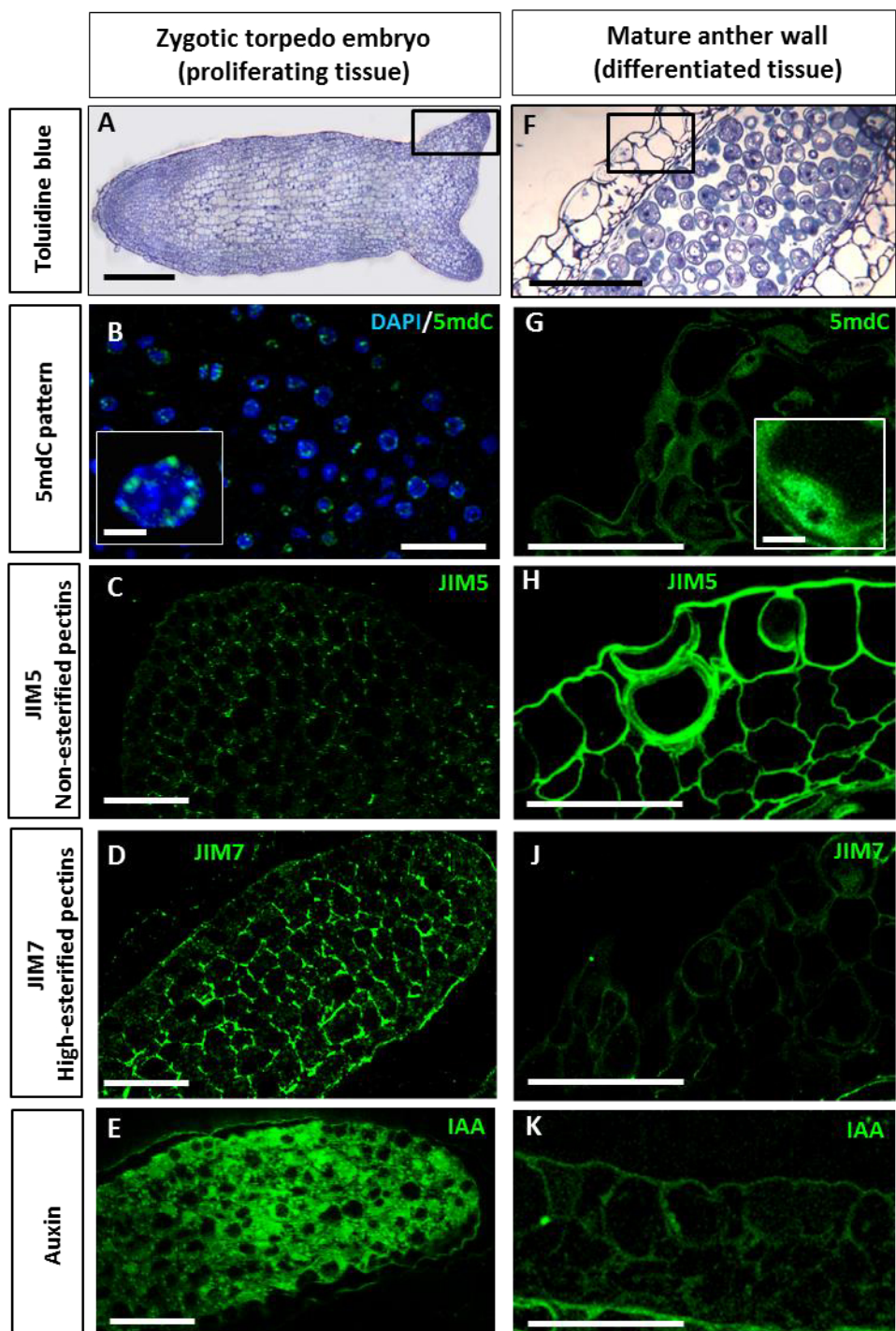


**Figure 6: Immunolocalization of auxin (IAA) at early *in vitro* embryogenesis of microspore and immature zygotic embryos.** A-F: Microspore embryogenesis. G-L: Somatic embryogenesis of immature zygotic embryos. A, B, C, G, H, I: Resin sections stained by toluidine blue. D, E, F, J, K, L: Confocal images of IAA immunofluorescence signal (green); in some images, DAPI staining of nuclei (blue) is also shown merged with the green IAA signal (F, K, L). A, D: Microspores (mic). B, E, H, K: Early multicellular embryos (emb). C, F, I, L: Dense cells (arrows) from which early embryos originate at the surface of embryogenic masses (ms). Bars A, D: 50  $\mu$ m; B, C, E-L: 100  $\mu$ m.



**Figure 7: Effects of inhibiting auxin transport by NPA on *in vitro* embryogenesis initiation and progression.** Embryogenic masses originated by secondary embryogenesis from immature zygotic embryos. **A, B:** Control cultures, without NPA, at the beginning of the treatment (**A**) and 20 days afterwards (**B**), when embryo development and new embryos (arrows) were observed. **C, D:** Culture containing 40  $\mu$ M NPA at the beginning of the treatment (**C**) and 20 days afterwards (**D**), no further growth or new embryos were observed. Bars 5 mm.

The results of the comparative analysis between the two systems, proliferating embryo cells and non-embryogenic differentiated cells are shown in figure 8. In proliferating cells of the zygotic torpedo embryos (Fig. 8A), the patterns of immunolocalization observed with all antibodies were similar than the patterns found in early multicellular embryos developed *in vitro*. Methylated DNA, localized by anti-5mdC immunofluorescence, was scarce and distributed in small spots over nuclei (Fig. 8B). JIM5 and JIM7 antibodies revealing non-esterified and highly-esterified pectins respectively, exhibited localization patterns in which the walls of proliferating embryo cells appeared higher labeled with JIM7 than with JIM5 (Figs. 8C, D) indicating a higher proportion of esterified pectins in these cells. Auxin immunofluorescence signal was intense in the cytoplasm of the proliferating embryo cells (Fig. 8E) localized at the developing cotyledon tips of the torpedo embryo. On the contrary, the patterns of localization in the differentiated tissue of the anther wall (Fig. 8F) were opposite to those found in embryo cells. 5mdC signal was intense and covered the whole nuclear area (Fig. 8G), corresponding to abundant hypermethylated DNA. The cell walls of the anther tissues showed intense JIM5 signal and very low JIM7 signal which indicated a higher proportion of non-esterified pectins in these cell walls. Very low or no IAA signal was observed in differentiated cells of the anther wall layers (Fig. 8J).



**Figure 8: Immunolocalization of 5mdC, esterified (JIM7) and non-esterified (JIM5) pectins, and IAA in other systems.** **A-E:** Zygotic torpedo embryo of *Brassica napus*. **F-K:** Mature anther of *Quercus suber*. **A, F:** Panoramic views of zygotic torpedo embryo and mature anther, resin sections stained by toluidine blue; squares in **A** and **F** indicate representative regions of proliferating embryo cells (**A**) and differentiated cells of anther wall (**F**) where the analysis is focused. **B-E, G-K:** Higher magnifications of immunofluorescence signals (green) for 5mdC (**B, G**), JIM5 (**C, H**), JIM7 (**D, J**) and IAA (**E, K**) antibodies. In **B**, DAPI staining for nuclei (blue) is merged with 5mdC immunofluorescence (green). Insets in **B** and **G** show representative nuclei of each cell types, at high magnification. Bars: **A, F:** 50  $\mu\text{m}$ , **B-E, G-K:** 25  $\mu\text{m}$ , insets: 5  $\mu\text{m}$ .



## DISCUSSION

### **Global DNA methylation decrease accompanies nuclear remodeling in early embryo cells**

DNA methylation plays an essential role in plant growth as a mechanism to epigenetically maintain developmental fates in proliferating and differentiating cells (Solís et al. 2012; El-Tantawy et al. 2014; Valledor et al. 2007; Meijón et al. 2009; Testillano et al. 2013). In the present work, DNA methylation level and distribution pattern, in relation to chromatin changes, have been analyzed during early embryogenesis of the two pathways, of microspores and zygotic embryos, results suggesting that the initiation of both embryogenic processes is epigenetically regulated. Differences in global DNA methylation levels and changes in the 5-methyl-deoxy-cytidine (5mdC) distribution patterns were found in the early embryo cells of the two *in vitro* embryogenesis pathways analyzed, suggesting changes of nuclear activity. A significant decrease in global DNA methylation was observed in early multicellular embryos in comparison with microspores, immature zygotic embryos or embryogenic mass cells from both embryogenesis *in vitro* systems. Reports in tree species showed that the morphogenic capacity was associated with low levels of DNA methylation (Valledor et al. 2007) and a transient DNA demethylation of the ovules occurred after pollination [35]. In *Brassica napus*, a decrease of DNA methylation has been also reported at early stages of microspore embryogenesis (Solís et al. 2012).

The immunolocalization essays showed not only a decrease on the 5mdC labelling in the cells of early embryos derived from microspores and zygotic embryos, but also a change in the distribution pattern of 5mdC in small nuclear spots, in contrast with the 5mdC distribution pattern over large nuclear regions corresponding with highly condensed chromatin masses of non-embryo cells. This 5mdC distribution pattern over small heterochromatin masses correlates with the pattern found in active proliferating cells of root meristems (Testillano et al. 2013), and early microspore-derived embryos of rapeseed, *Brassica napus*, with high transcriptional activity and decondensed chromatin patterns (Seguí-Simarro et al. 2011; Solís et al. 2012). In contrast, 5mdC distribution over large heterochromatin masses has been associated with decreased cellular activity stages and cell differentiation, as in the generative/sperm cells of pollen grains, in the differentiating cells of advanced embryos (Solís et al. 2012; El-Tantawy et al. 2014) or in the tapetal cells during the high chromatin condensation occurring during their developmental programmed cell death (Solís et al. 2014).

The data presented here revealed an epigenetic change associated with the switch towards the embryogenic developmental program and with the activation of cell proliferation occurring at the

beginning of embryogenesis in the two pathways studied, microspore embryogenesis through anther culture and somatic embryogenesis from immature zygotic embryos, for the first time in a woody species, cork oak.

### **Cell walls of early embryo cells exhibit higher levels of esterified pectins**

Increasing evidence has linked the cell wall remodeling with many processes involved in plant growth and development, including somatic embryogenesis (Guillemin et al. 2005; Chapman et al. 2000; van Hengel et al. 2001). Several monoclonal antibodies have been used to unravel the involvement of specific cell wall epitopes in controlling cell growth and morphogenesis; specifically, there are different studies on antigen distribution detected by the antibodies JIM5 and JIM7 recognizing non-esterified and highly-esterified pectins respectively, in several plant tissues and organs (Goldberg et al. 1986; Dolan et al 1997; Hasegawa et al. 2000). In the present work, we have used both JIM5 and JIM7 antibodies to analyze changes in cell wall associated with *in vitro* embryogenesis initiation in *Quercus suber* L.

In very young microspore-derived embryos of herbaceous species (*Capsicum annuum* and *Brassica napus*), a high level of esterified pectins was observed in the cell walls (Bárány et al 2010a, 2010b; Solís et al 2012). Using an *in situ* localization approach at both light and electron microscopy levels, it has been reported that in walls of proliferating cells, the levels of esterified pectins were higher than in the differentiating cells, which showed cell walls rich in non-esterified pectins (Bárány et al 2010a, 2010b). Differences in the proportion of esterified pectins between microspores and microspore-derived embryos were reported in tree species, such as *Quercus suber*, *Citrus clementina*, and *Olea europaea* (Ramírez et al. 2004; Solís et al. 2008; Ramírez et al. 2003).

The results presented here showed differences in the distribution pattern of highly-esterified pectins in early embryo cells in comparison with non-embryogenic cells, in the two pathways (embryogenesis of microspores and zygotic embryos) in cork oak. Highly-esterified pectins were more abundant in early embryo cell walls than in microspores, zygotic embryo and embryogenic mass cells, while they diminished with embryo development and differentiation. This evidence was consistent with the abundance of esterified pectins in the newly-formed walls of proliferating cells of young microspore-derived embryos and root tip meristematic cells of some herbaceous species (Bárány et al 2010a, 2010b), thus providing experimental support indicating that a high proportion of esterified pectins in walls is not only a marker for proliferation events, but also an early marker of both reprogramming pathways to embryogenesis, of microspores and immature zygotic embryos origins.

Our results showed that, in contrast with the inner cell walls, the peripheral wall layer that surrounds the early multicellular embryos was labeled by JIM5. Previous reports have described the presence of a thick wall underneath the exine, the special microspore wall, in embryogenic microspores and young embryos of various species, like *Capsicum annuum* and *Olea europaea* (Bárány et al 2005; Solís et al. 2008). The development of those peripheral thick wall in early stages of somatic embryogenesis and organogenesis, and also microspore embryogenesis, has been reported as a specific feature of these processes (Bárány et al 2005; Solís et al. 2008; Fortes et al. 2002), though the nature of this wall has not been elucidated yet. It has been proposed that this layer could constitute an organized network with differential wall components which may create a specific cellular environment with altered permeability and receptors, providing conditions to express morphogenic competence (Fortes et al. 2002). The present study reveals that at early stages of the two *Quercus suber* *in vitro* embryogenesis pathways, from microspores and immature zygotic embryos, there is also a peripheral wall in early multicellular embryos with a differentially higher proportion of non-esterified pectins than the inner cell walls, providing additional evidences of the existence of special wall structures surrounding groups of cells committed for entering the cell cycle and initiate the embryogenic program.

### **High endogenous auxin level is present in early embryo cells**

Many aspects of auxin action depend on its local biosynthesis and differential distribution within plant tissues, mainly regulated by its directional transport between cells (Petrášek et al. 2009). We have analyzed the endogenous auxin IAA distribution and level during early stages in the two embryogenesis pathways, from microspore and immature zygotic embryos, in cork oak, *in vitro* systems in which the embryo development occurs in a medium free of exogenous IAA (Manzanera et al 1993; Bueno et al. 1997). Interestingly, the IAA immunolocalization assays revealed a differential and significant increase of the IAA endogenous levels in the early multicellular embryo cells, in comparison with the microspores, immature zygotic embryos and embryogenic mass cells which showed very low IAA signal. In *Arabidopsis*, auxin has been localized by the expression of the auxin-responsive promoter DR5 in cells of the embryo proper at very early stages (Möller et al. 2009; Robert et al. 2013). IAA biosynthesis is associated with rapidly dividing and rapidly growing tissues, especially in shoots and roots, free auxin concentrations in the living plant are in the apical meristems of shoots, young leaves, root meristems and lateral root initiation sites (Himanen et al. 2002; Prasad and Dhonukshe et al. 2013). In a new *Brassica napus* microspore embryogenesis *in vitro* system at low temperature, our group reported preliminary results showing that IAA also localized in cells of early multicellular embryos (Prem et al. 2012), similarly to early zygotic embryogenesis.

The results presented here indicate the increase of endogenous levels of IAA in the formation of early multicellular embryos of both microspore and zygotic embryo origins, in *Quercus suber*. This result, together with the fact that the inhibition of auxin transport by NPA negatively affected embryogenesis initiation and development suggest that endogenous IAA biosynthesis and transport would be involved in the activation of proliferation and the switch of the embryogenic program of the reprogrammed microspores, zygotic embryo and embryogenic mass cells.

**Early embryogenesis from microspores and zygotic embryos exhibits similar early markers: epigenetic changes by DNA hypomethylation, cell wall remodelling by high pectin esterification and high endogenous auxin levels**

*In vitro* embryogenesis initiation and progression is conditioned by many factors, still largely unknown. The comparative analysis performed here during the early stages of embryogenesis in two different *in vitro* systems, microspore embryogenesis through anther cultures and somatic embryogenesis from immature zygotic embryo cultures, in a woody species, *Quercus suber*, has permitted the identification of differential cell features, summarized in table 1, specific to the reprogramming process towards embryogenesis, as early markers which are similar in both embryogenesis pathways from microspore and immature zygotic embryos in cork oak. These differential features are the decrease of DNA methylation, the remodeling of cell walls by increasing the proportion of esterified pectins, and the accumulation of endogenous auxin in the cells that initiate the embryogenic program. The present work provides new evidences of two important questions for the understanding of the *in vitro* embryogenesis process. On one hand, the reported data reveal that several basic cellular features undergo similar changes in the two different embryogenesis pathways studied at early stages, indicating that basic cellular processes underlying early *in vitro* embryogenesis are common to various systems and suggesting that general mechanisms could regulate the process independently of the cell type origin and culture conditions. Moreover, the results illustrate the relevance of three cellular processes which specifically occur in early embryo cells just after induction, while the same cellular changes are not observed neither before embryogenesis initiation neither at advanced developmental stages, fact that permits to consider these features (DNA hypomethylation, cell wall remodeling by high esterification of pectins, and endogenous auxin increase) as early markers of the process, opening the possibility to design strategies for efficient manipulation of *in vitro* protocols to improve yields.

A previous cytochemical and immunocytochemical study compared the structural organization of advanced globular embryos of both origins, microspores and immature zygotic embryos, finding

similar anatomy and cellular organization patterns in both of them; the common features found concerned high vacuolization, small nuclear size and structure, abundant ribosomal population, and presence of starch granules (Bueno et al. 2003). Studies in stress-induced microspore embryogenesis and somatic embryogenesis of other species have indicated the involvement of epigenetic marks (Solís et al. 2012; El-Tantawy et al. 2014), cell wall components (Solís et al. 2008; Fortes et al. 2002; Bárány et al. 2010a, 2010b; El-Tantawy et al. 2013) and endogenous phytohormones (García-Martin et al. 2005; Prem et al. 2012; Larsson et al. 2008) in the initiation and progression of organogenesis and embryogenesis. Some of the markers described here in cork oak have been also found in other plant species, for example, DNA hypomethylation has been observed in microspore embryos of *Brassica napus* (Solís et al. 2012) and *Hordeum vulgare* (El-Tantawy et al. 2014), a high proportion of esterified pectins in cell walls was described in microspore embryos of *Capsicum annum* (Bárány et al. 2010a, 2010b), and production of endogenous auxin in early embryos was found in microspore embryogenesis of rapeseed (Prem et al. 2012). The present work is the first report on microspore and somatic embryogenesis in a forest tree, that shows all these cellular processes during the initiation of two different embryogenesis pathways which are induced by different *in vitro* protocols. Interestingly, the reported cell modifications were observed not only in early embryos originated directly from microspore and zygotic embryos, but also in secondary embryos produced from embryogenic masses, at early stages. In contrast, these features were not found in the cells that originated the embryos (microspores and immature zygotic embryo cells) before embryogenesis induction. Moreover, they were also found in proliferating cells of zygotic embryos of other plant species, *B. napus*, whereas differentiated cells of mature organs, as revealed in mature anthers here, showed opposite features than early embryo cells regarding DNA methylation, pectin esterification and endogenous auxin content. The fact that the same differential cell features appear in the two early embryo cells of both origins, from microspores and immature zygotic embryos, produced by primary or secondary embryogenesis indicate that they can be considered as early markers of *in vitro* embryogenesis. As stated before, some of them have been reported individually in embryos of other plants (Solís et al. 2012; El-Tantawy et al. 2014; Bárány et al. 2010a, 2010b; Prem et al. 2012) and, in the present work, the three features were found on proliferating cells of zygotic embryos in a different species, *Brassica napus*, these data support the idea that these early markers reflect a general behavior that could be exploited for other species.

Increasing evidences have documented the effect of different phytohormones, including auxin, in signaling processes of cell wall remodeling, necessary for cell elongation and growth, and in chromatin remodeling for the activation of specific gene expression developmental programs. The

changes reported here affecting epigenetic marks and cell wall polymers are associated with the accumulation of auxin in early embryo cells, this data could reflect different processes that are interconnected in complex regulatory mechanisms that control cell reprogramming and embryogenesis initiation.

	Before embryogenesis induction	After embryogenesis induction
Early markers	Cells from which embryos originate (microspores, immature zygotic embryos, embryogenic masses)	Early embryos (derived from microspores, immature zygotic embryos and embryogenic masses)
DNA methylation level	High (++)	Low (+/-)
DNA methylation pattern	Large chromatin masses	Small chromatin masses
Highly-esterified pectins in cell walls	Mid (+)	High (++)
Peripheral wall layer (rich in non-esterified pectins)	Not present (-)	Present (+)
Endogenous auxin	Low (+/-)	High (++)

Table 1: Early markers present in embryogenesis of both microspores and immature zygotic embryos origins

### CONCLUSIONS

The identification of early markers of embryogenesis can help to monitor the metabolic processes involved in the induction providing a wider understanding of the physiology and mechanisms controlling plant cell reprogramming and embryogenic competence acquisition. The present work is the first report that shows, by a comparative analysis during the early stages of embryogenesis, that various cellular processes, DNA hypomethylation, cell wall remodeling by increasing pectin esterification, and endogenous auxin increase, occur concomitantly at early stages of two embryogenesis pathways, microspore embryogenesis and embryogenesis from immature zygotic embryos, which are induced by different *in vitro* protocols, identifying similar early embryogenic markers in *Quercus suber*. The data reported here, in a woody species, which have shown to be extremely recalcitrant to *in vitro* embryogenesis, is of particular relevance. The information gained will be useful to increase our knowledge on the regulatory mechanisms and involved factors in the *in vitro* induction of embryogenesis, opening the door to identify novel strategies and selective targets for improving the efficiency of the process in biotechnology, agronomic and forestry breeding programs.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Work supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) project BFU2011-23752 and Spanish National Research Council (CSIC) project PIE 201020E038. HRS is recipient of a FPI predoctoral fellowship of MINECO (BES-2009-014245). We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

## **DISCUSIÓN**





## DISCUSIÓN GENERAL

El proceso de embriogénesis de microsporas, aunque es hoy en día ampliamente utilizado por empresas viverísticas y semilleras, tiene importantes limitaciones para su explotación por la baja eficiencia de inducción y progresión de la embriogénesis en muchas especies de interés económico o medioambiental. Aun son bastante desconocidos los mecanismos que inducen la reprogramación de una célula somática diferenciada o en proceso de diferenciación y su conversión en respuesta a estrés en una célula totipotente capaz de formar un embrión y una planta sin el proceso de fusión de gametos. Los esfuerzos para desvelar los mecanismos de regulación del proceso de reprogramación y adquisición de competencia embriogénica de la microspora, realizadas fundamentalmente en sistemas *in vitro* de microsporas aisladas de especies modelo para este proceso, como *Brassica napus* (colza), han proporcionado una información limitada hasta ahora, siendo los datos en especies leñosas recalcitrantes mucho más escasos.

El equipo de investigación donde se ha realizado esta tesis trabaja desde hace años en diseccionar los mecanismos reguladores de la reprogramación de la microspora, su adquisición de competencia embriogénica mediante estrés y el desarrollo embriogénico *in vitro*, habiendo identificado diversos factores y procesos implicados. Esta tesis doctoral supone un paso adelante en el análisis de nuevos factores implicados en el proceso, aportando además nuevos datos en una especie leñosa recalcitrante.

En esta Tesis doctoral se ha estudiado la embriogénesis de polen, utilizando los sistemas *in vitro* de microsporas aisladas de *Brassica napus* (sistema modelo) y el cultivo de anteras de *Quercus suber* (especie recalcitrante) comparando con la embriogénesis somática de embriones cigóticos inmaduros. El estudio se ha realizado con un abordaje multidisciplinario analizando varios procesos clave implicados en su regulación como son: los cambios epigenéticos, los cambios en la distribución de auxina endógena (reguladora del crecimiento) y modificaciones en la composición de la pared celular durante la reprogramación de la microspora y desarrollo embriogénico, los resultados indican además que estos cambios pueden ser utilizados como marcadores tempranos de embriogénesis.

Se ha descrito, que los cambios epigenéticos, sean modificaciones covalentes post-traduccionales de las histonas, pequeños RNAs o la metilación del DNA pueden modular la expresión génica, en procesos tan importantes como el desarrollo, la floración, la interacción planta-patógeno y los procesos de senescencia. La microspora, en la etapa de microspora vacuolada (González-Melendi et al. 1995), se reprograma de una ruta gametofítica a una ruta embriogénica mediante la aplicación de un estrés por temperatura, convirtiéndose en una célula totipotente, por lo que el patrón

epigenético debe reconfigurarse completamente durante este proceso. Trabajos recientes de nuestro grupo, han demostrado cambios en el patrón de metilación del DNA durante la embriogénesis del polen de *Brassica napus* (Solís et al. 2012), observándose modificaciones la metilación de las células del embrión frente a la microspora vacuolada.

En esta tesis se han analizado los cambios en otras marcas epigenéticas, las modificaciones de histonas durante la embriogénesis del polen de *Brassica napus*, y se ha estudiado la metilación del DNA en otra especie leñosa, el *Quercus suber*. Se han observado cambios en los niveles de la histona dimetilada H3, H3K9me2 (marca epigenética represora de actividad génica), y en el nivel de acetilación de las histonas H3 y H4, H3Ac y H4Ac (marca activadora de actividad génica), las cuales presentan diferente patrón de distribución en las células no-embriogénicas que en aquellas que se han reprogramado y originado un embrión. Así mismo, hemos encontrado que el patrón de expresión de dos genes de metil y acetil transferasa de histonas específicos, BnHKMT y BnHAT respectivamente, correlacionan con los patrones de inmunolocalización de los anticuerpos específicos de las formas metiladas y acetiladas. El análisis del nivel y patrón de metilación del DNA durante la embriogénesis de polen y somática de embrión cigótico en *Quercus suber*, ha revelado una dinámica similar en las dos rutas y análoga a la encontrada en *Brassica napus* (Solís et al. 2012). En ambas especies la reprogramación e inicio de embriogénesis va acompañada de un descenso en la metilación del DNA.

Estos datos revelan que hay una sucesión de eventos de reprogramación epigenética que afectan tanto al DNA como a las histonas durante la embriogénesis de la microspora, hasta ahora desconocidos, que se discutirán en detalle más adelante en esta discusión.

Se sabe que la hormona vegetal auxina tiene un papel muy importante en el desarrollo y formación del embrión (Review en Moller y Weijers 2009; Rademacher et al. 2012) pero todavía no se conoce el mecanismo molecular de esta hormona en las primeras etapas de la embriogénesis.

En este trabajo hemos estudiado por primera vez la dinámica de la auxina endógena durante el proceso de reprogramación de la microspora comparando dos especies diferentes, una herbácea, la colza, y una leñosa, el alcornoque, y dos sistemas de embriogénesis *in vitro* también muy diferentes, la embriogénesis de polen, a través del cultivo líquido de microsporas aisladas de *Brassica napus*, y mediante el cultivo de anteras de *Quercus suber*, y la embriogénesis somática derivada de embriones cigóticos inmaduros del alcornoque.

La embriogénesis del polen de *Brassica napus*, es un sistema ideal para estudiar el efecto de la auxina endógena ya que ocurre de manera directa a partir de células individuales, las microsporas, en un

medio de cultivo sin reguladores de crecimiento exógenos y además el proceso mimetiza la embriogénesis cigótica (Testillano et al. 2002; Bueno et al. 2003; Bárány et al. 2005; Massoneau et al. 2005; Prem et al. 2012). Aunque en muchos sistemas de cultivo *in vitro* de embriogénesis se conoce el efecto que tiene la adicción al medio de cultivo de auxinas sintéticas (Raghavan et al. 2004; Bárány et al. 2005; Elhiti y Stasolla 2011) no hay datos de los niveles endógenos de esta hormona vegetal en las primeras etapas de la embriogénesis, por lo que la información que se aporta en este trabajo sobre la implicación de la biosíntesis, transporte y acción de la auxina endógena en el inicio de la embriogénesis puede ser muy útil para conocer mejor el funcionamiento de los mecanismos reguladores de la embriogénesis y de los factores que están implicados en el proceso.

Se han descrito con anterioridad cambios en la composición en la pared celular durante diversos procesos de desarrollo en otras especies como: la remolacha, achicoria y zanahoria (Guillemin et al. 2005; Chapman et al. 2000; van Hegel et al. 2001), pero son muy escasos los datos sobre estos cambios al inicio de la embriogénesis en una especie leñosa, a excepción de trabajos previos del grupo donde se ha realizado esta tesis, en mandarino, olivo y estudios preliminares en alcornoque (Ramírez et al. 2003, 2004; Solís et al. 2008). Estos cambios se han detectado mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen pectinas no-esterificadas y pectinas esterificadas, JIM5 y JIM7 respectivamente, de los que se conocía su reactividad en otros tejidos y órganos (Goldberg et al. 1986; Dolan et al. 1997; Hasegawa et al. 2000). Asimismo, trabajos previos de nuestro grupo han mostrado cambios en la composición de la pared celular en embriones tempranos derivados de microsporas en otra especie herbácea, el pimiento, y en meristemas radiculares de cebolla (Bárány et al. 2010a, 2010b), en los que se observa un alto nivel de pectinas esterificadas en procesos de proliferación celular. Los resultados obtenidos en *Quercus suber* indican, que los niveles de pectinas esterificadas son mayores en las paredes celulares de las células embriogénicas en proliferación que en aquellas células en diferenciación en los dos sistemas *in vitro* analizadas, embriogénesis de microsporas y embriogénesis procedente de embriones cigóticos inmaduros. Estos resultados indican que en la remodelación de la pared celular encontramos un marcador de proliferación y de embriogénesis, la alta proporción de pectinas esterificadas.

En esta Tesis se ha analizado la dinámica de varios factores con un papel clave en la reprogramación e inicio de embriogénesis, que además constituyen marcadores de embriogénesis aportando datos sobre la regulación del proceso y la identificación de nuevos abordajes y estrategias para mejorar el proceso en los programas de mejora, así como en otros procesos biotecnológicos y agronómicos.

## **1. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS DE HISTONAS Y SU PAPEL EN LA EMBRIOGÉNESIS DEL POLEN DE *Brassica napus***

En este estudio se han analizado las marcas epigenéticas de metilación y acetilación de histonas las cuales se encuentran implicadas en muchos procesos celulares, entre los que están la reprogramación de las células a embriogénesis y la diferenciación celular.

Los resultados obtenidos muestran que las modificaciones post-traduccionales de las histonas cambian dinámicamente durante la embriogénesis del polen. La di-metilación de la lisina 9 de la histona H3, H3K9me2, y la acetilación de las histonas H3 y H4, H3Ac y H4Ac, tienen diferentes patrones de distribución que correlacionan con el patrón de expresión de genes de metil y acetil transferasas de histonas específicos, revelando sucesos de reprogramación epigenéticas durante la embriogénesis de la microspora.

### **1a. Correlación entre los cambios de H3K9me2 y la expresión de BnHKMT durante la embriogénesis de polen y su asociación con la diferenciación del embrión**

Nuestros resultados revelan un progresivo aumento de H3K9me2 después de la reprogramación de la microspora y durante el desarrollo del embrión, alcanzando su nivel más alto en la etapa de embrión globular y torpedo, indicando la asociación de esta marca epigenética con la heterocromatinización y la diferenciación celular. La inmunolocalización revela una alta señal de H3K9me2 en las células en diferenciación, las cuales muestran una alta heterocromatinización, en células localizadas en la periferia de los embriones torpedo en desarrollo. Se ha descrito que H3K9me2 está asociada con elementos transponibles de silenciamiento y heterocromatina en diferentes sistemas vegetales (Saze et al. 2012; Liu et al. 2012). Por otro lado, también existen datos que indican que H3K9me2 está íntimamente asociada con la metilación del DNA en plantas y es requerida para la formación de la heterocromatina (Stancheva 2005; Zhou et al. 2010). La relación entre H3K9me2 y la metilación del DNA es crítica para el mantenimiento del silenciamiento génico de regiones del genoma y para su estabilización (Liu et al. 2010). De igual manera a H3K9me2 estudios recientes de nuestro grupo de investigación han mostrado que la metilación del DNA incrementa progresivamente durante la embriogénesis del polen, en determinadas etapas de la diferenciación del embrión en cultivos de microsporas de *Brassica napus* (Solís et al. 2012). Los cambios en los niveles de metilación del DNA muestran un perfil temporal similar al perfil de H3K9me2 presentado en este estudio. Las células del embrión diferenciado, que muestran unas masas heterocromatinícas mayores, tienen unos niveles más altos de metilación del DNA y de heterocromatina (Solís et al. 2012). De igual manera hemos identificado una distribución

diferencial de H3K9me2 en las células en etapas de diferenciación y proliferación del embrión, sugiriendo que ambas marcas epigenéticas, la metilación del DNA y la H3K9me2, están íntimamente asociadas en las células del embrión e incrementan con la diferenciación celular, acompañando a la heterocromatinización. Análisis previos sobre los patrones de condensación cromatínica han mostrado que ésta se incrementa durante la progresión de embriogénesis del polen y con la diferenciación celular del embrión en *Brassica napus* y otros sistemas (Testillano et al. 2000 y 2005; Seguí-Simarro et al. 2011; Solís 2012; El-Tantawy et al. 2014). También se han descrito diferentes patrones de condensación cromatínica, metilación del DNA, metilación de la histona H3K9 y algunas variantes de la H3 en el núcleo vegetativo y generativo del polen maduro en diferentes especies (Houben et al. 2011; Seguí-Simarro et al. 2011; Banaei-Moghaddan et al. 2012; Solís 2012; Hoffman y Palmgren 2013; González-Sánchez et al. 2014), y estas diferencias han sido relacionadas con cambios de actividad transcripcional y destinos celulares. Nuestros datos muestran cambios dinámicos en la estructura de la cromatina durante la embriogénesis del polen que van acompañados por cambios en la metilación del DNA y en la proporción de H3K9me2.

El análisis de la expresión génica de la metiltransferasa de lisina de histonas BnHKMT analizado, ha aportado datos que correlacionan con la dinámica de la marca epigenética estudiada.

Los patrones de expresión muestran que la transcripción de BnHKMT está inducida durante la embriogénesis del polen y correlaciona con el perfil de cambios de H3K9me2 en las mismas etapas del desarrollo. Los elevados niveles de H3K9me2 durante la embriogénesis del polen ocurren de manera paralela con el aumento de expresión de BnHKMT, lo que sugiere que BnHKMT contribuye y es responsable, al menos en parte, a la formación y estabilización de H3K9me2, como una marca epigenética asociada con condensación de la cromatina en procesos de diferenciación a lo largo de la embriogénesis del polen.

#### **1b. Correlación de cambios en acetilación de histonas y expresión de BnHAT durante la embriogénesis del polen y su asociación con la totipotencia celular y proliferación**

En contraste con la H3K9me2, la acetilación de las histonas H3 y H4, (H3Ac y H4Ac), se ha encontrado en altos niveles en la microspora vacuolada antes de la inducción de la embriogénesis, junto con bajos niveles de condensación cromatínica. El alto nivel de descondensación de la cromatina ha sido estudiado mediante microscopía electrónica en la microspora vacuolada de *Brassica napus* (Seguí-Simarro et al. 2011). Este patrón de decondensación está relacionado con una alta actividad transcripcional en esta etapa del desarrollo (Testillano et al. 2005). La acetilación de histonas ha sido asociada con un incremento en la actividad génica (Liu et al. 2012). La metilación del DNA y la de-acetilación de la histona H4 actúan simultánea y coordinadamente,

reestructurando la cromatina y regulando la expresión génica durante la diferenciación floral (Meijón et al. 2009). La alta acetilación de H3 y H4 y la baja metilación del DNA en la microspora vacuolada están asociadas a la alta actividad transcripcional y el patrón de descondensación cromatínica de las microsporas vacuoladas en *Brassica napus* y otras especies (Testillano et al. 2005; Seguí-Simarro et al. 2011; Solís et al. 2012). El genoma de las células totipotentes de animales y plantas se caracteriza por características epigenéticas únicas y una conformación cromatínica descondensada (Grafi et al. 2011; Hezroni et al. 2011; Onder et al. 2012); la configuración abierta de la cromatina se ha descrito como una característica fundamental de las células vegetales totipotentes ya que esta confiere a las células la capacidad de un cambio rápido a nuevos programas transcripcionales mediante inducción por distintas señales (Grafi et al. 2011).

Las enzimas de modificación cromatínica, incluyendo las acetiltransferasas de histonas, "Histone Acetyl Transferases" HATs, han sido propuestas como moduladores de la reprogramación celular mediante la distribución en el genoma de modificaciones de histonas (como la acetilación de H3 y H4) y promoviendo los estados de cromatina abierta (Onder et al. 2012). Evidencias recientes han revelado que las variaciones epigenéticas juegan un papel crucial en la capacidad de reprogramación de las células de líneas embrionarias en las cuales la alta capacidad de reprogramación está asociada con altos niveles de H3Ac, los cuales pueden inducirse mediante tratamientos con inhibidores de la histona de-acetilasa (Herzoni et al. 2011). Nuestros resultados muestran altos niveles de H3Ac y H4Ac y de expresión de HAT en la microspora vacuolada, célula con capacidad de reprogramarse a célula totipotente mediante la inducción por estrés y entrar en proliferación. Estos datos proporcionan nuevas evidencias de que la acetilación de histonas y la actividad de HATs constituyen moduladores de capacidad de reprogramación celular y de adquisición del estado de totipotencia celular.

Nuestros datos muestran que la acetilación de histonas disminuye después del tratamiento de estrés y la reprogramación de la microspora, mientras que se incrementa de nuevo en las etapas más avanzadas de desarrollo del embrión. Los resultados de la inmunolocalización muestran un incremento en la señal de H3Ac y H4Ac en los núcleos de células meristemáticas del embrión en etapas avanzadas del desarrollo. La de-metilación del DNA seguida por un incremento en la acetilación de histonas H3 y H4 sucede de manera simultánea durante la reactivación del ciclo celular, así como durante la salida de la dormición del meristemo y el rápido crecimiento en patata (Law y Shuttle 2004). Se han caracterizado muchos mutantes de genes HAT en *Arabidopsis* que están afectados en diferentes aspectos del crecimiento y desarrollo, alguno de ellos presentando un descenso en la proporción de división celular (Nellisen et al. 2005); mientras que otros genes HAT son requeridos para la división celular durante la gametogénesis (Latrasse et al. 2008).

Nuestros resultados muestran que el patrón de expresión de *BnHAT* está altamente relacionado con los perfiles temporales de H3Ac y H4Ac durante la embriogénesis de la microspora. Así, se han encontrado altos niveles de acetilación en la microspora vacuolada, una célula preparada para entrar en mitosis y producir el grano de polen bicelular durante la gametogénesis, y niveles mucho más altos de acetilación de histonas y de expresión de HAT en las células proliferantes de los embriones avanzados. Estos resultados revelan la implicación de la acetilación de histonas y las acetil transferasas de histonas en la activación del ciclo de división celular en células proliferantes del embrión como se ha sugerido en otros sistemas vegetales (Servet et al. 2010; Meijón et al. 2009).

## **2. PAPEL DE LA AUXINA ENDÓGENA EN EL INICIO Y PROGRESIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS DE POLEN INDUCIDA POR ESTRÉS EN *Brassica napus***

Cada vez hay más evidencias de que la hormona vegetal auxina juega un papel muy importante en la formación y desarrollo del embrión (Review in Moller y Weijers 2009; Rademacher et al. 2012), pero el mecanismo molecular de la acción de la auxina durante las fases tempranas de la embriogénesis no está bien conocido. La embriogénesis de microsporas inducida por estrés constituye un sistema muy interesante para estudiar la embriogénesis vegetal ya que ésta mimetiza el patrón de desarrollo de la cigótica (Testillano et al. 2002; Bueno et al. 2003; Bárány et al. 2005; Massoneau et al. 2005; Prem et al. 2012). La iniciación de la embriogénesis del polen y su progresión está condicionada por muchos factores (Maluzinsky et al. 2003), sin embargo, la dinámica de la auxina endógena en el proceso no ha sido estudiada todavía ni tampoco el papel de la auxina en la reprogramación de la microspora y progresión del embrión. En este estudio hemos analizado la dinámica de la auxina durante la embriogénesis de microsporas de *Brassica napus* inducida por estrés, sistema *in vitro* en el que todo el proceso ocurre en un medio libre de reguladores de crecimiento, “Plant Growth Regulators”, (PGRs) y que ocurre de manera directa desde una única célula (la microspora) hasta el embrión, sin la formación de ninguna estructura de transición, masa embriogénica o callo embriogénico, como ocurre en otros sistemas de embriogénesis *in vitro*. A pesar de que se conocen ampliamente los efectos estimulantes de la adición de PGRs externos, incluyendo auxinas sintéticas como 2,4-D, en la inducción de la embriogénesis *in vitro* (Raghavan et al. 2004; Bárány et al. 2005; Elhiti y Stasolla 2011), poco se conoce de los niveles endógenos de estos reguladores en las etapas iniciales de la embriogénesis. Esta información puede ser muy útil para incrementar nuestro conocimiento de los mecanismos reguladores y factores hormonales implicados en la embriogénesis del polen para mejorar la eficiencia del proceso, abriendo la puerta



a identificar nuevas estrategias y dianas específicas en programas biotecnológicos y agronómicos de mejora.

## **2a. La reprogramación de la microspora e inicio de embriogénesis está asociada al aumento de auxina endógena y de expresión de BnNIT2**

En este estudio se han analizado los niveles endógenos de ácido indol-acético, IAA, auxina endógena mayoritaria, mediante LCES-MS/MS y su distribución con inmunofluorescencia y análisis bajo microscopio láser confocal. Los resultados mostraron que las microsporas aisladas antes del tratamiento de estrés inductor presentan bajos niveles de IAA, detectados por la cuantificación absoluta mediante LC/ESI-MSMS y por la inmunolocalización y análisis en microscopio confocal. La cuantificación de IAA revela un progresivo incremento de los niveles de IAA endógeno durante la progresión de la embriogénesis del polen, en las etapas de embrión globular-torpedo y embrión cotiledonar. El hecho de que en las etapas tempranas durante las primeras divisiones embriogénicas y la formación de embriones multicelulares tempranos, la concentración de IAA no fuera significativamente diferente del nivel de IAA en la microspora vacuolada antes de la inducción es debido al bajo número y pequeño tamaño de los embriones multicelulares tempranos que no permiten su separación del alto número de microsporas no-embriogénicas que coexisten en el cultivo, por lo que los dos tipos de estructuras se recogieron juntas para la cuantificación por LC/ESI-MSMS. Los análisis realizados *in situ* revelaron que el porcentaje de embriones multicelulares tempranos era mucho menor que las microsporas no-embriogénicas en estas muestras resultando un bajo valor de concentración de IAA en esa etapa del cultivo. Sin embargo, la inmunolocalización de IAA y la cuantificación de la señal de inmunofluorescencia revelaron un incremento diferencial y significativo de los niveles de IAA endógeno en las células de los embriones multicelulares tempranos en etapas iniciales, de 2-3 células, en comparación con las microsporas que no responden a la inducción de embriogénesis las cuales mostraron una señal muy baja de IAA. En *Arabidopsis*, la señal auxina ha sido localizada por la expresión del promotor de respuesta a auxina DR5 en células del embrión en etapas muy tempranas, desde el embrión bicelular hasta la etapa de 8-células (Moller y Weijers 2009, Robert et al. 2013); la localización de elementos de la maquinaria de biosíntesis y transporte de auxinas en las células del suspensor sugieren que la auxina es distribuida por el suspensor al embrión desde etapas muy tempranas en la embriogénesis cigótica (Roberts 2013). Se ha descrito que distintos elementos de la maquinaria de respuesta a auxinas se expresan desde etapas iniciales de la embriogénesis y controlan el destino celular de diferentes células en el embrión, sugiriendo la existencia de una especificación dependiente de auxinas de los tipos celulares del embrión (Rademacher et al. 2012). En un nuevo sistema *in vitro* de embriogénesis de polen en *B.napus*

mediante estrés a baja temperatura con la formación de estructuras tipo suspensor, nuestro grupo ha obtenido resultados preliminares que muestran que el IAA también está localizado en las células de los embriones multicelulares tempranos, estando mucho menos presente en las células de las estructuras tipo suspensor (Prem et al. 2012), al igual que ocurre en la embriogénesis cigótica. En el sistema *in vitro* de inducción de embriogénesis de polen en *B.napus* mediante inducción por calor que se ha analizado en el presente estudio, no se observan estructuras tipo suspensor y el IAA está localizado en las células del embrión desde la primera división sugiriendo que la biosíntesis de auxina se activa de manera paralela a la reprogramación de las microsporas a embriogénesis.

En una de las rutas de biosíntesis de auxina dependiente de Triptofano denominada ruta del IAOX, las nitrilasas (NITs) tienen un papel clave en el último paso, catalizando la conversión de IAN en IAA; se han identificado varios genes NIT en muchas especies, incluyendo *B.napus* (Mano y Nemoto 2012, Ishikawa et al. 2007). La baja expresión del gen *BnNIT2* encontrado en la microspora vacuolada antes de la inducción de embriogénesis y el incremento significativo de su expresión en la etapa de embrión multicelular temprano proporcionan evidencias adicionales de la activación de la biosíntesis de IAA después de la reprogramación por estrés de la microspora a célula totipotente, la adquisición de competencia embriogénica y la iniciación de la embriogénesis del polen.

La biosíntesis de IAA está asociada con tejidos de rápida división y crecimiento, especialmente en ápices y raíces; la mayor concentración de auxina libre en la planta se encuentra en el meristemo apical del tallo, las hojas jóvenes, el meristemo radicular y los sitios de iniciación de las raíces laterales (Himanen et al. 2002; Prasad y Dhonukshe 2013). En sistemas *in vitro*, la adición exógena de dos fitohormonas, auxinas y citoquininas, tiene un papel fundamental en la inducción de la división celular y el control de la progresión del ciclo celular; el ayuno de auxinas causa la detención de la división celular en las células en suspensión y en el cultivo de tejidos de varias especies vegetales. Sin embargo, aunque la acción concreta de las auxinas en el ciclo celular no es totalmente conocida, hay numerosos datos que evidencian que las auxinas actúan en múltiples dianas influyendo directamente o indirectamente sobre la regulación transcripcional y post-transcripcional del ciclo celular (Himmanen et al. 2002, review en Perrot-Rechenmann 2010). La reprogramación por estrés de las microsporas como células totipotentes inicialmente incluye la activación del ciclo celular y la formación del embrión bicelular y multicelular, después de varias divisiones, cuyas células muestran características típicas de células en proliferación (Testillano et al. 2005; Bárány et al. 2005; Solís 2012; El-Tantawy et al. 2014). Los resultados obtenidos indican el incremento de los niveles de IAA en la formación de los embriones tempranos derivados de polen, desde el embrión de 2-3 células, sugiriendo que la biosíntesis endógena de IAA podría estar implicada en la

activación de la proliferación en la microspora vacuolada reprogramada y en las células del embrión temprano.

## **2b. La progresión de la embriogénesis del polen es bloqueada por la inhibición de la acción de la auxina con PCIB**

La auxina puede conjugarse con una gran variedad de otras moléculas, convirtiéndolas en inactivas; la síntesis *de novo* y la hidrólisis de los conjugados contribuyen a la regulación de la homeostasis de auxinas mediante el incremento de los niveles de auxina activa (Teale et al. 2006). Los experimentos de inmunodeplección del anticuerpo anti-IAA con IAA sintético muestran una completa ausencia de señal de inmunofluorescencia y una nula reactividad cruzada con otras moléculas endógenas como conjugados de IAA y otros compuestos de interacción con el IAA, demostrando que los ensayos de inmunolocalización marcan la distribución del IAA libre. Durante la iniciación de la embriogénesis del polen y su progresión, no sólo el contenido en IAA endógeno libre y la expresión de genes de biosíntesis a IAA están altamente incrementados, también los receptores y los elementos de respuesta de IAA deben actuar en este proceso. Los tratamientos con PCIB se han usado para inhibir la acción de la auxina en diferentes procesos fisiológicos (Oono et al. 2003). Aunque el mecanismo molecular del PCIB no ha sido completamente elucidado, se cree que el PCIB bloquea los receptores de auxina pero sin afectar al transporte de la misma (Oono et al. 2003).

En este estudio, hemos llevado a cabo tratamientos con el inhibidor de la respuesta a auxina PCIB para determinar la implicación de la acción de la auxina en la embriogénesis del polen; los resultados obtenidos muestran que la presencia de PCIB durante el proceso afecta fuertemente a la progresión y desarrollo del embrión y hace que descienda drásticamente el número de embriones maduros producidos, indicando que no sólo su presencia sino también la percepción y acción del IAA están implicadas en el desarrollo del embrión derivado de polen.

## **2c. El bloqueo del transporte polar de auxinas por NPA cambia la distribución intracelular de auxina en el embrión y disminuye la eficiencia embriogénica**

La distribución diferencial de auxinas es necesaria en muchos procesos del desarrollo en plantas, incluyendo el desarrollo del embrión y la especificación del eje apical-basal. Durante la embriogénesis cigótica, la auxina se acumula durante las etapas tempranas en posiciones específicas que están relacionadas con etapas posteriores del desarrollo (Petrášek y Firml 2009). El máximo de auxina local y los gradientes se forman mayoritariamente por el transporte célula a célula y por el flujo direccional correcto el cual está dirigido por la localización y la acción concentrada de los

transportadores PIN (Petrášek y Firml 2009). En diferentes estudios se ha empleado la inhibición del transporte de auxinas mediante NPA, el cual inhibe el flujo de salida de auxinas de la célula uniéndose a la proteína transportadora PIN, observándose que interfiere con el desarrollo normal del embrión cigótico en muchas especies vegetales y sistemas *in vitro* de embriogénesis somática (Larsson et al. 2008; Moller y Weijers 2009; Hakman et al. 2009; Abrahamsson et al. 2012). Estos estudios por tanto han puesto de manifiesto el papel del transporte de auxinas en la formación del embrión (Chen et al. 2010; Prasad y Dhonukshe 2013).

Nuestros resultados de inmunolocalización revelan que, en etapas muy tempranas, la distribución de las auxinas es homogénea en embriones con simetría radial, mientras que en los embriones corazón-torpedo se acumula en las partes apical y basal, mostrando gradientes de concentración desde la punta de los cotiledones hasta la región central. Los tratamientos con el inhibidor del transporte polar de auxinas NPA dan como resultado diferentes patrones de distribución de auxinas a los embriones control, revelados por la inmunolocalización del IAA, demostrando la implicación del transporte de IAA en el establecimiento de la acumulación local de la auxina. Así mismo los tratamientos con NPA también producen efectos deletéreos en el desarrollo del embrión originando un gran descenso en el número de embriones maduros producidos, lo que indica además el papel crucial del transporte polar de auxinas en la embriogénesis del polen. El retraso en el progreso del embrión y el hecho de que muchos embriones detengan su desarrollo en la etapa de embrión globular, con la concentración más alta de NPA empleada (40  $\mu$ M), evidencia la implicación del transporte polar de auxinas en la embriogénesis del polen especialmente en la etapa en la que se produce el cambio de simetría radial a simetría bilateral, el embrión corazón-torpedo, como ocurre en la embriogénesis cigótica (Petrášek y Firml 2009; Prasahad y Dhonukshe 2013). Así mismo, otros trabajos han indicado el papel del transporte polar de auxina en la especificación del eje apical-basal en la embriogénesis del maíz, demostrando que la diferenciación del primordio y el desarrollo del escutelo requieren del transporte polar de auxinas que modifica fuertemente el tratamiento con NPA, el cual bloquea la iniciación del primordio foliar y provoca la pérdida completa de la morfología y simetría normal del escutelo (Forestan y Varotto 2012).

Un resultado interesante ha sido el hecho de que la inhibición del transporte polar de auxinas por NPA produce cambios en la distribución de IAA no solo a nivel del embrión, en los embriones corazón-torpedo, sino también a nivel intracelular en los embriones multicelulares tempranos. La presencia de pequeños “spots” citoplasmáticos de IAA sugiere la acumulación de auxinas en compartimentos subcelulares no observados en las células de embriones no tratados. Además del mecanismo de transporte intercelular de auxinas a través de la membrana plasmática, por las proteínas transportadoras PIN (Prasad y Dhonukshe 2013) se han propuesto otras hipótesis de

secreción de auxinas vía reciclaje de vesículas endocíticas (Schlicht et al. 2006; Baluška et al. 2010; Nishimura et al. 2011; Baluška y Mancuso 2013), y recientemente ha sido propuesto un modelo de mecanismo alternativo de transporte polar de auxinas que implica su retención intracelular y una liberación tipo interruptor desde el retículo endoplasmático (Wabnik et al. 2011). Nuestras observaciones de las acumulaciones de IAA en pequeños compartimentos citoplasmáticos revelados por la inmunofluorescencia en el microscopio laser confocal en las células de los embriones con el transporte de auxinas inhibido, apoya la existencia de este tipo de rutas de transporte de auxinas en las que está implicada la compartimentación intracelular dinámica.

### **3. FACTORES COMUNES A LAS RUTAS DE EMBRIOGÉNESIS, DE MICROSPORAS Y EMBRIONES CIGÓTICOS, COMO MARCADORES TEMPRANOS DE CÉLULAS EMBRIOGÉNICAS.**

En este estudio hemos identificado marcadores tempranos de embriogénesis que están presentes en ambas rutas embriogénicas, la que procede de microsporas y la que procede de embriones cigóticos inmaduros, del alcornoque, una especie de amplio interés agronómico y forestal. En esta especie actualmente se están desarrollando nuevos sistemas de selección de líneas de interés, en los que los sistemas de embriogénesis *in vitro* pueden tener un importante papel. Sin embargo, debido a la recalcitrancia que presenta esta especie y a su baja eficiencia de embriogénesis *in vitro* de las especies leñosas su explotación es aún limitada, ya que los factores clave responsables de la reprogramación y progresión del embrión son aun desconocidas.

Los resultados muestran que las células de los embriones tempranos presentan cambios definidos en diversos componentes celulares, concretamente en los niveles de DNA, la proporción de pectinas esterificadas de la pared celular y los niveles de auxina endógenos en los dos sistemas de embriogénesis *in vitro*. Estas marcas no fueron encontradas en células no embriogénicas y son diferentes en las células del embrión con respecto a las microsporas y las células del embrión cigótico inmaduro antes del inicio de la embriogénesis, por lo que constituyen marcadores tempranos de embriogénesis.

### **3a. Al inicio de la embriogénesis la metilación global del DNA disminuye y el patrón de heterocromatina cambia a masas de pequeño tamaño**

La metilación del DNA juega un papel esencial en el desarrollo de las plantas como mecanismo epigenético en células en proliferación y diferenciación (Valledor et al. 2007; Berdasco et al. 2008; Meijón et al. 2009; Solís 2012; Solís et al. 2014; Testillano et al. 2013). En el presente trabajo, el análisis de los niveles de metilación del DNA y su patrón de distribución durante la embriogénesis del polen y de embriones cigóticos inmaduros, en etapas tempranas, ha revelado que el inicio de ambos procesos embriogénicos está regulado epigenéticamente. Las diferencias en los niveles de metilación global de DNA y los cambios en el patrón de distribución de la 5-metil-deoxi-citidina (5mdC) aparecen en las células de las primeras etapas del embrión en las dos rutas embriogénicas *in vitro*. Se ha observado un descenso significativo en la metilación global del DNA en los embriones multicelulares tempranos en comparación con las microsporas o los embriones cigóticos inmaduros antes de la inducción. Los resultados en otras especies arbóreas muestran que la capacidad morfogénica está asociada con bajos niveles de metilación del DNA (Valledor et al. 2010) y en los óvulos después de la polinización se ha detectado una demetilación transitoria del DNA (Viejo et al. 2010). Así mismo en *Brassica napus*, después de la reprogramación del polen, en las primeras etapas de la embriogénesis, también se produce un descenso en la metilación del DNA (Solís et al. 2012).

Los análisis mediante inmunomarcado con 5mdC muestran no sólo un descenso en la señal de 5mdC en las células de los embriones tempranos de polen y somáticos del alcornoque, además muestran un cambio en el patrón de distribución de 5mdC en pequeños "spots" nucleares, en contraste con la localización de 5mdC en grandes regiones nucleares que corresponden con masas de cromatina condensada de las células antes de la inducción. Esta dinámica en el patrón de distribución de la 5mdC se correlaciona con la alta actividad transcripcional y un patrón de cromatina descondensada presente en células activas y proliferantes de meristemos de raíz (Testillano et al. 2013), y en embriones jóvenes derivados de polen de colza (Seguí-Simarro et al. 2011; Solís et al. 2012). En contraposición, la distribución de la 5mdC sobre grandes masas de heterocromatina se ha asociado con procesos de diferenciación celular, como en el caso de las células generativas y espermáticas del grano de polen, o las células diferenciadas en estados avanzados de embriogénesis (Solís et al. 2012; El Tantawy et al. 2014) o, más recientemente en la heterocromatinización de las células del tapetum en procesos de muerte celular programada durante su desarrollo (Solís et al. 2014).

Nuestros resultados revelan una modificación epigenética asociado con el cambio hacia el programa embriogénico y con la activación de la proliferación celular que ocurre al principio de la

embriogénesis en las dos rutas, embriogénesis de polen y del embrión cigótico inmaduro, por vez primera en una especie leñosa, el alcornoque.

### **3b. La pared celular aumenta la proporción de pectinas esterificadas en los embriones multicelulares tempranos**

Existen evidencias de que el remodelado de la pared celular está unido a muchos procesos implicados en el crecimiento y desarrollo de la planta, incluyendo la embriogénesis somática (Chapman et al. 2000; van Hengel et al. 2001). Para desvelar la implicación de epítomos específicos de la pared celular en el control del crecimiento celular y la morfogénesis se han empleado anticuerpos monoclonales; específicamente, hay diferentes estudios sobre la distribución de los antígenos detectados por los anticuerpos JIM5 y JIM7, que reconocen pectinas no-esterificadas y pectinas esterificadas respectivamente, en muchos tejidos vegetales y diferentes órganos (Goldberg et al. 1986; Dolan et al. 1997; Guglielmino et al. 1997; Hasegawa et al. 2000). En el presente trabajo, se han utilizado ambos anticuerpos JIM5 y JIM7, para analizar los cambios en la pared celular asociados con la iniciación de la embriogénesis *in vitro* en *Quercus suber*, en dos sistemas de embriogénesis diferentes, a partir de microsporas y de embriones cigóticos inmaduros.

En los embriones muy jóvenes derivados de polen de especies herbáceas, como el pimiento y la colza, se ha observado un alto nivel de pectinas esterificadas en las paredes celulares (Bárány et al. 2010a, 2010b, Solís 2012). Usando un abordaje mediante localización *in situ* a ambos niveles, microscopia óptica y electrónica de transmisión, se ha encontrado que en las paredes celulares de las células proliferantes, el nivel de pectinas esterificadas era mayor que en las células diferenciadas, las cuales presentan unas paredes celulares ricas en pectinas no-esterificadas (Bárány et al. 2010a, 2010b). Las diferencias en la proporción de pectinas esterificadas entre las microsporas y los embriones derivados de microsporas se ha estudiado en algunas especies arbóreas, como *Citrus clementina* y *Olea europaea* (Ramírez et al. 2004; Solís et al. 2008) así como estudios preliminares en *Quercus suber* (Ramírez et al. 2003).

Los resultados presentados en este trabajo muestran diferencias en el patrón de distribución de pectinas esterificadas en las células embriogénicas tempranas en comparación con las células no embriogénicas, en las dos rutas (embriogénesis del polen y somática derivada de embriones cigóticos inmaduros) del alcornoque. Las pectinas muy esterificadas se encontraron en mayor proporción en las paredes celulares de los embriones tempranos que en las microsporas y embriones cigóticos inmaduros y su proporción disminuye con el desarrollo y diferenciación del embrión. Esta evidencia es consistente con la abundancia de pectinas esterificadas en las paredes recién formadas de las células proliferantes en embriones jóvenes derivados de polen y en las células meristemáticas

del ápice de la raíz de algunas especies herbáceas (Bárány et al. 2010a). Los resultados obtenidos añaden nuevas evidencias que sugieren que la alta proporción de pectinas esterificadas en las paredes celulares constituyen un marcador de procesos de proliferación y además es un marcador temprano de la reprogramación a embriogénesis de microsporas y de embrión cigótico inmaduro.

Nuestros resultados muestran que, al contrario que las paredes celulares interiores del embrión multicelular temprano, la pared periférica que rodea el embrión está marcada con JIM5, es decir, es rica en pectinas no-esterificadas. Trabajos previos describen la presencia de una pared celular engrosada debajo de la exina, la pared especial del polen, en las microsporas embriogénicas y en embriones jóvenes derivados de polen de varias especies como el pimiento y el olivo (Bárány et al. 2005; Solís et al. 2008). La formación de estos engrosamientos de la pared celular alrededor de los embriones tempranos en etapas iniciales de la embriogénesis del polen, embriogénesis somática y de la organogénesis han sido descritas como una característica específica de estos procesos (Fortes et al. 2002; Bárány et al. 2005; Solís et al. 2008). Se ha propuesto que esta capa periférica puede constituir una red organizada con diferentes componentes de la pared que pueden crear un ambiente celular específico con la permeabilidad y los receptores alterados, lo que proporcionaría a las células que rodea, las condiciones necesarias para expresar competencia morfogénica (Fortes et al. 2002). En el presente estudio también hemos observado en etapas tempranas de la embriogénesis del polen y somática de *Quercus suber* la presencia de una pared celular periférica en los embriones multicelulares tempranos con una mayor proporción de pectinas no esterificadas que a las paredes celulares interiores, lo que aporta nuevas evidencias sobre la existencia de estructuras especiales de la pared celular que rodean grupos de células que se han reprogramado y van a entrar en proliferación e iniciar el programa o ruta embriogénica.

### **3c. El desarrollo de embriones multicelulares tempranos requiere el incremento y acumulación diferencial de auxina intracelular**

Muchos aspectos de la acción de la auxina dependen de su biosíntesis local y su distribución diferencial en los tejidos vegetales, principalmente regulada por su transporte direccional entre las células (Petrášek y Friml 2009). Hemos analizado la distribución de auxina endógena durante la embriogénesis del polen y de embrión cigótico inmaduro en alcornoque, dos sistemas *in vitro* en el que la embriogénesis se desarrolla en un medio libre de auxinas exógenas. Los ensayos de inmunolocalización del ácido indol-acético, IAA, la forma mayoritaria de auxina endógena, han revelado un aumento significativo en los niveles de IAA endógeno en los embriones multicelulares tempranos, en comparación con las células no embriogénicas las cuales muestran muy baja señal de IAA. La biosíntesis de IAA está asociada a tejidos que se encuentran en proliferación y rápida



división y crecimiento, especialmente en ápices y raíces. La auxina libre se encuentra concentrada en el meristemo apical del tallo y de las raíces, en las hojas jóvenes y en los sitios de iniciación de las raíces laterales (Himanen et al. 2002; Prasad y Dhonukshe 2013). En un estudio reciente en que se caracteriza un nuevo sistema de embriogénesis del polen de *B. napus* a baja temperatura, nuestro grupo ha mostrado resultados preliminares que muestran que el IAA también está concentrado en células de embriones multicelulares tempranos (Prem et al. 2012), al igual que ocurre en la embriogénesis cigótica.

Los resultados presentados en este trabajo indican el incremento de los niveles de IAA endógeno durante la formación del embrión multicelular temprano en ambos sistemas embriogénicos, de polen y de embrión cigótico inmaduro, en *Quercus suber*, sugiriendo que la biosíntesis endógena de IAA puede estar implicada en la activación de la proliferación y en el control del cambio al programa embriogénico de las células reprogramadas de los explantos y de las masas embriogénicas.

### **3d. Las dos rutas embriogénicas, de microsporas y de embrión cigótico inmaduro, muestran los mismos marcadores tempranos: hipometilación del DNA, alta esterificación de pectinas y altos niveles de auxina**

En este trabajo se ha realizado el análisis comparativo durante las etapas tempranas de la embriogénesis en dos sistemas *in vitro* con orígenes diferentes, la embriogénesis del polen y la embriogénesis somática de embriones cigóticos inmaduros, en una especie leñosa, el *Quercus suber*, lo cual ha permitido la identificación de características celulares diferenciales, específicas de los procesos de reprogramación a embriogénesis, los cuales constituyen marcadores comunes para ambas rutas de embriogénesis, en el alcornoque. Estas características diferenciales son el descenso de la metilación del DNA, la remodelación de las paredes celulares mediante el aumento en la proporción de pectinas esterificadas, la formación de una pared periférica rica en pectinas no esterificadas y la acumulación de auxina en las células que inician el programa embriogénico. Diversos estudios han indicado la implicación de marcas epigenéticas (Solís 2012; El-Tantawy et al. 2014); componentes de la pared celular (Fortes et al. 2002; Solís et al. 2008; Bárány et al. 2010a; 2010b; El-Tantawy et al. 2014) y hormonas vegetales endógenas (García-Martin et al. 2005; Larsson et al. 2008; Prem et al. 2012) en la iniciación y progresión de organogénesis y embriogénesis en diferentes sistemas *in vitro* y especies vegetales. Sin embargo, el presente trabajo, en una especie forestal, es el primer estudio que revela todos estos procesos celulares como características de la iniciación de las dos rutas embriogénicas, embriogénesis del polen y embriogénesis somática de embriones cigóticos inmaduros, las cuales se desarrollan mediante protocolos *in vitro* diferentes. El

hecho de que las mismas características celulares diferenciales aparezcan en las células de los embriones tempranos de ambos orígenes, microsporas y embrión cigótico, indica que pueden ser consideradas como marcadores tempranos de la embriogénesis *in vitro*.

Cada vez hay más datos sobre el efecto de diferentes hormonas vegetales, incluyendo la auxina, en procesos de señalización de remodelación de la pared celular, necesaria para la elongación y crecimiento celular, así como la implicación de algunas hormonas en la remodelación de la cromatina para la activación de la expresión de genes específicos de programas de desarrollo. Los marcadores tempranos identificados en esta tesis implican cambios en las marcas epigenéticas y en polímeros de la pared celular, los cuales están asociados con la acumulación de auxina en las células de los embriones tempranos. Estos datos podrían reflejar diferentes procesos que están interconectados entre sí dentro de los mecanismos de regulación complejos que controlan la reprogramación celular y la iniciación de la embriogénesis.

La iniciación de la embriogénesis *in vitro* y su progresión están condicionadas por numerosos factores, muchos de los cuales siguen sin conocerse. La identificación de marcadores tempranos de embriogénesis comunes a distintos sistemas puede ayudar a monitorizar los procesos metabólicos implicados en la inducción, ampliando el conocimiento de la fisiología y los mecanismos que controlan la reprogramación de la célula vegetal y la adquisición de la competencia embriogénica. En este sentido, los datos aportados en este estudio, en una especie leñosa, las cuales son mayoritariamente recalcitrantes a la embriogénesis *in vitro*, son de especial relevancia. La información obtenida será muy útil para incrementar nuestro conocimiento sobre los mecanismos reguladores y los factores implicados en la inducción *in vitro* de embriogénesis, abriendo la puerta al diseño de nuevos protocolos y dianas en procesos biotecnológicos de utilidad para programas de mejora de especies cultivadas y forestales.



**CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**



## CONCLUSIONES

1. La forma dimetilada de la histona H3, H3K9me2, aumenta progresivamente durante la embriogénesis de polen, siendo más abundante en núcleos de células diferenciadas en embriones avanzados.
2. El gen de la metil-transferasa de histonas, BnHKMT, se induce progresivamente con la embriogénesis de polen, teniendo su máxima expresión en embriones en diferenciación y correlacionándose su perfil de expresión con el de H3K9me2.
3. Las formas acetiladas de histonas H3Ac y H4Ac durante la embriogénesis de polen tienen un perfil de distribución similar entre ellas y diferente a la de la forma dimetilada H3K9me2, aumentando en la microspora vacuolada y en células proliferantes del embrión.
4. El patrón de expresión del gen de la acetil-transferasa de histonas BnHAT durante la embriogénesis de polen es similar al perfil de H3Ac y H4Ac, y está asociado a la reprogramación y adquisición de totipotencia de la microspora vacuolada y proliferación celular en etapas posteriores de la embriogénesis.
5. La concentración de IAA endógeno aumenta con la inducción de embriogénesis de polen, desde la primera división y progresivamente durante el desarrollo.
6. El IAA endógeno se distribuye homogéneamente en las primeras etapas de la embriogénesis y de forma polarizada en embriones torpedo, siguiendo un patrón análogo a la embriogénesis cigótica.
7. La expresión del gen BnNIT2, nitrilasa de la ruta biosintética de auxina de brassicaceas, se induce con el inicio y progresión de la embriogénesis de polen, correlacionándose con el aumento del nivel de auxina endógena.
8. La inhibición de la acción de la auxina por PCIB afecta al desarrollo embriogénico de las microsporas y reduce drásticamente la formación de embriones.
9. La inhibición del transporte polar de auxina por NPA a bajas concentraciones produce retraso en el desarrollo y un descenso en la formación de embriones, y a altas concentraciones bloquea el desarrollo del embrión en la fase globular.
10. En los embriones tempranos derivados de microsporas tratados con NPA se modifica la distribución de auxina intracelular, concentrándose en pequeños compartimentos, posiblemente elementos del retículo endoplásmico o de la ruta secretora.
11. Se han establecido en el laboratorio de Biotecnología del Polen de Plantas Cultivadas del CIB, donde se ha realizado esta tesis, dos sistemas de embriogénesis *in vitro* de *Quercus suber*, de polen y de embriones cigóticos inmaduros.
12. Las dos rutas de embriogénesis *in vitro*, a partir de microsporas o de embriones cigóticos, en *Quercus suber*, presentan cambios celulares similares en las primeras etapas tanto en la

formación de embriones primarios como secundarios, por lo que pueden considerarse marcadores tempranos de embriogénesis.

13. Al inicio de la embriogénesis en los dos sistemas de *Quercus suber*, se produce un descenso de los niveles de metilación global del DNA y un cambio en el patrón de distribución nuclear del DNA metilado en pequeñas masas de heterocromatina.
14. Las células de los embriones tempranos de *Quercus suber* presentan mayor concentración de auxina endógena que las células no embriogénicas.
15. En las primeras etapas de la embriogénesis, la proporción de pectinas esterificadas aumenta en las paredes celulares del embrión temprano de *Quercus suber*.
16. Se han identificado como marcadores tempranos de embriogénesis: la hipometilación del DNA, el aumento de auxina endógena y el aumento de pectinas esterificadas en la pared celular.

## CONCLUSIONS

1. The dimethylated state of the histone H3, H3K9me<sub>2</sub>, increases progressively during pollen embryogenesis, being more abundant in nuclei of differentiated cells in advanced embryos.
2. The gene expression of the histone methyl-transferase BnHKMT, is progressively induced with pollen embryogenesis, with its highest expression during embryo differentiation; its expression profile correlates with that of H3K9me<sub>2</sub>.
3. The acetylated states of histones H3Ac and H4Ac during pollen embryogenesis have similar distribution profiles between them, but different than the dimethylated mark H3K9me<sub>2</sub>, increasing in vacuolated microspore and in proliferating embryo cells.
4. The expression pattern of the gene of the histone acetyl-transferase BnHAT has similar profile to H3Ac and H4Ac during pollen embryogenesis, it is associated with the reprogramming and totipotency acquisition of the vacuolated microspore and with cell proliferation at late embryogenesis.
5. The endogenous IAA concentration increases with the induction of pollen embryogenesis, from the first division and progressively during development.
6. Endogenous IAA is homogeneously distributed in the early embryogenesis stages and polarized in torpedo embryos, following a pattern similar to zygotic embryogenesis.
7. The gene expression of BnNIT2, nitrilase of the auxin biosynthetic pathway of Brassicaceae, is induced with the onset and progression of pollen embryogenesis, correlating with increased endogenous auxin levels.
8. Inhibition of auxin action by PCIB affects embryogenic development of microspores and drastically reduces the formation of embryos.
9. Inhibition of polar auxin transport by low NPA concentrations produces developmental delay and decreases embryo formation; high NPA concentrations block the development at the stage of globular embryo.
10. In the early microspore-derived embryos treated with NPA, auxin intracellular distribution is modified and concentrated on small compartments, possibly elements of the endoplasmic reticulum or the secretory pathway.
11. Two *in vitro* embryogenesis systems of *Quercus suber* have been established in the laboratory of Pollen Biotechnology of Crop Plants at CIB, where this thesis was performed, pollen embryogenesis and embryogenesis from immature zygotic embryos.
12. The two pathways of embryogenesis *in vitro*, in *Quercus suber*, from microspores or zygotic embryos, display similar cellular changes at early stages of primary and secondary embryos formation, which can be considered as early markers of embryogenesis.



13. At the beginning of embryogenesis in both *Quercus suber* systems, a decrease in global levels of DNA methylation and a change of its pattern of nuclear distribution in small masses of heterochromatin occur.
14. The cells of early embryos of *Quercus suber* show higher concentrations of endogenous auxin than non embryogenic cells.
15. At the early stages of embryogenesis, the proportion of esterified pectins increases in the cell walls of *Quercus suber* embryos.
16. DNA hypomethylation, increased endogenous auxin and esterified pectins increase in cell wall have been identified as early markers of embryogenesis.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abrahamsson, M., Valladares, S., Larsson, E., Clapham, D., & Arnold, S.** (2012). Patterning during somatic embryogenesis in Scots pine in relation to polar auxin transport and programmed cell death. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109(3), 391-400.
- Ahmadi, B., Alizadeh, K., & Teixeira da Silva, J.A.** (2012). Enhanced regeneration of haploid plantlets from microspores of *Brassica napus* L. using bleomycin, PCIB, and phytohormones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109(3), 525-533.
- Ahmed, R., Dutta Gupta, S., & De, D. N.** (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf derived callus of winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC]. *Plant Cell Rep*, 15(7), 531-535.
- Alberts, B., Jonhson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P.** (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4<sup>th</sup> Ed. New York: Garland Science.
- Alberts, A.F., Geneste, O., Geneste O.F. & Treisman, R.** (1998). Activation of SRF-regulated chromosomal templates by Rho-family GTPases requires a signal that also induces H4 hyperacetylation. *Cell*, 20, 92(4):475-487
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., & Mirsky, A. E.** (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51, 786-794.
- Alonso-Ramírez, A., Rodríguez, D., Reyes, D., Jiménez, J. A., Nicolas, G., López-Climent, M., Gómez-Cadenas, A., Nicolas, C.** (2009). Cross-talk between gibberellins and salicylic acid in early stress responses in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Signal Behav*, 4(8), 750-751.
- Andersen, SvenB.** (2005). Haploids in the Improvement of Woody Species. In C. E. Don Palmer, W. Keller & K. Kasha (Eds.), *Haploids in Crop Improvement II* (Vol. 56, pp. 243-257): Springer Berlin Heidelberg.
- Arnholdt-Schmitt, B.** (2004). Stress-induced cell reprogramming. A role for global genome regulation? *Plant Physiol*, 136(1), 2579-2586.
- Baluška, F., & Mancuso, S.** (2013). Root apex transition zone as oscillatory zone. *Front Plant Sci*, 4, 354.
- Baluška, F., Mancuso, S., Volkmann, D., & Barlow, P.W.** (2010). Root apex transition zone: a signalling–response nexus in the root. *Trends in Plant Science*, 15(7), 402-408.
- Banaei-Moghaddam, A. M., Schubert, V., Kumke, K., Weibeta, O., Klemme, S., Nagaki, K., Macas, J., González-Sánchez, M., Heredia, V., Gómez-Revilla, D., González-García, M., Vega, J.M., Puertas, M.J., Houben, A.** (2012). Nondisjunction in favor of a chromosome: the mechanism of rye B chromosome drive during pollen mitosis. *Plant Cell*, 24(10), 4124-4134

- Bannister, A.J., & Kouzarides, T.** (2005). Reversing histone methylation. *Nature*, 436(7054), 1103-1106.
- Bárány, I., Fadón, B., Risueño, M.C., & Testillano, P.S.** (2010a). Cell wall components and pectin esterification levels as markers of proliferation and differentiation events during pollen development and pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. *J Exp Bot*, 61(4), 1159-1175.
- Bárány, I., Fadón, B., Risueño, M.C., & Testillano, P.S.** (2010b). Microspore reprogramming to embryogenesis induces changes in cell wall and starch accumulation dynamics associated with proliferation and differentiation events. *Plant Signal Behav*, 5(4), 341-345.
- Bárány, I., González-Melendi, P., Fadón, B., Mityko, J., Risueño, M.C., & Testillano, P.S.** (2005). Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biol Cell*, 97(9), 709-722.
- Barbin, A., Montpellier, C., Kokalj-Vokac, N., Gibaud, A., Niveleau, A., Malfoy, B., Dutrillaux, B., Bourgeois, C.A.** (1994). New sites of methylcytosine-rich DNA detected on metaphase chromosomes. *Hum Genet*, 94(6), 684-692.
- Bártová, E., Krejci, J., Harnicarova, A., Galiova, G., & Kozubek, S.** (2008). Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem*, 56(8), 711-721.
- Berdasco, M., Alcazar, R., García-Ortiz, M. V., Ballestar, E., Fernández, A. F., Roldan-Arjona, T., Tiburcio, A.F., Altabella, T., Buisine, N., Quesneville, H., Baurdy, A., Lepiniec, L., Alaminos, M., Rodríguez, R., Lloyd, A., Colot, V., Bender, J., Canal, M.C., Esteller, M., Fraga, M. F.** (2008). Promoter DNA hypermethylation and gene repression in undifferentiated Arabidopsis cells. *PLoS One*, 3(10), e3306.
- Bitonti, M.B., Cozza, R., Chiappetta, A., Giannino, D., Ruffini Castiglione, M., Dewitte, W., Mariotti, D., Van Onckelen, H., Innocenti, A.M.** (2002). Distinct nuclear organization, DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile, juvenile-like and adult vegetative apical meristems in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *J Exp Bot*, 53(371), 1047-1054.
- Bonga, J.M.** (1992). In Vitro Propagation of Conifers: Fidelity of the Clonal Offspring. In M. R. Ahuja (Ed.), *Woody Plant Biotechnology* (Vol. 210, pp. 13-21): Springer US.
- Brero, A., Easwaran, H.P., Nowak, D., Grunewald, I., Cremer, T., Leonhardt, H., & Cardoso, M.C.** (2005). Methyl CpG-binding proteins induce large-scale chromatin reorganization during terminal differentiation. *J Cell Biol*, 169(5), 733-743.
- Brumos, J., Alonso, J.M., & Stepanova, A.N.** (2014). Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. *Physiologia Plantarum*, 151(1), 3-12.
- Bueno, M.A., Pintos, B., Höfer, M., & Martin, A.** (2005). Pro-embryos induction from *Olea*

*europaea* L. isolated microspore culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27(4), 695-701

- Bueno, M.A., Astorga, R., & Manzanera, J.A.** (1992). Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. *Physiologia Plantarum*, 85, 30-34.
- Bueno, M.A., Gómez, A., Boscaiu, M., Manzanera, J.A., & Vicente, O.** (1997). Stress-induced formation of haploid plants through anther culture in cork oak (*Quercus suber*). *Physiologia Plantarum*, 99(2), 335-341.
- Bueno, M.A., Gómez, A., Sepulveda, F., Seguí, J.M., Testillano, P.S., Manzanera, J.A., & Risueño, M.C.** (2003). Microspore-derived embryos from *Quercus suber* anthers mimic zygotic embryos and maintain haploidy in long-term anther culture. *J Plant Physiol*, 160(8), 953-960.
- Caffall, K.H., & Mohnen, D.** (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr Res*, 344(14), 1879-1900.
- Cardoso, H.G., Campos, M.C., Pais, M.S., Peixe, A.** (2010) Use of morphometric parameters for tracking ovule and microspore evolution in grapevine (*Vitis vinifera* L., cv Aragonez) and evaluation of their potential to improve *in vitro* somatic embryogenesis efficiency from gametophyte tissues. *In vitro Cellular & developmental Biology-Plant* 46(6) 499-508.
- Castillo, P., Márquez, J., Rubluo, A., Hernández, G., & Lara, M.** (2000). Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis* ssp. *procera* via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Sci*, 151(2), 115-119.
- Chapman, A., Blervacq, A.S., Vasseur, J., & Hilbert, J.L.** (2000). Arabinogalactan-proteins in Cichorium somatic embryogenesis: effect of beta-glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta*, 211(3), 305-314.
- Chen, D., Ren, Y., Deng, Y., & Zhao, J.** (2010). Auxin polar transport is essential for the development of zygote and embryo in *Nicotiana tabacum* L. and correlated with ABP1 and PM H<sup>+</sup>-ATPase activities. *J Exp Bot*, 61(6), 1853-1867.
- Cordewener, J.H.G., Hause, G., Görgen, E., Busink, R., Hause, B., Dons, H.J.M., Van Lammeren, A.A., Van Lookeren, C., Michiel, M., Pechan, P.** (1995). Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. *Planta*, 196(4), 747-755.
- Corredoira, E., San-José, M.C., & Vieitez, A.M.** (2012). Induction of somatic embryogenesis from different explants of shoot cultures derived from young *Quercus alba* trees. *Trees*, 26(3), 881-891.
- Corredoira, E., Toribio, M., & Vieitez, A.M.** (2014). Clonal Propagation via Somatic Embryogenesis in *Quercus* spp *Tree Biotechnology*: CRC Press.

- Costa, M., Nobre, M.S., Becker, J.D., Masiero, S., Amorim, M.I., Pereira, L.G., & Coimbra, S. (2013).** Expression-based and co-localization detection of arabinogalactan protein 6 and arabinogalactan protein 11 interactors in Arabidopsis pollen and pollen tubes. *BMC Plant Biol*, 13, 7.
- Costa, S., & Shaw, P. (2007).** 'Open minded' cells: how cells can change fate. *Trends Cell Biol*, 17(3), 101-106.
- Custers, J.B., Cordewener, J.H., Nollen, Y., Dons, H.J., & Van Lockeren Campagne, M.M. (1994).** Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep*, 13(5), 267-271.
- Custers, J.B.M. (2003).** Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). In M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster & I. Szarejko (Eds.), *Doubled Haploid Production in Crop Plants* (pp. 185-193): Springer Netherlands.
- Dammer E.B., Leon, A., & Sewer, M.B. (2007).** Coregulator exchange and sphingosine-sensitive cooperativity of steroidogenic factor-1, general control nonderepressed 5, p54, and p160 coactivators regulate cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent cytochrome P450c17 transcription rate. *Mol. Endocrinol* 21 (2): 415-438
- David Law, R., & Suttle, J.C. (2004).** Changes in histone H3 and H4 multi-acetylation during natural and forced dormancy break in potato tubers. *Physiol Plant*, 120(4), 642-649.
- De Smet, I., Lau, S., Mayer, U., & Jurgens, G. (2010).** Embryogenesis - the humble beginnings of plant life. *Plant J*, 61(6), 959-970.
- de Vries, S. C., Booij, H., Meyerink, P., Huisman, G., Wilde, H.D., Thomas, T.L., & van Kammen, A. (1988).** Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta*, 176(2), 196-204.
- Dolan, L., Linstead, P., & Roberts, K. (1997).** Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 48(3), 713-720.
- Domozych, D.S., Serfis, A., Kiemle, S.N., & Gretz, M.R. (2007).** The structure and biochemistry of charophycean cell walls: I. Pectins of *Penium margaritaceum*. *Protoplasma*, 230(1-2), 99-115.
- Dubas, E., Moravcikova, J., Libantova, J., Matusikova, I., Benkova, E., Zur, I., & Krzewska, M. (2014).** The influence of heat stress on auxin distribution in transgenic *B. napus* microspores and microspore-derived embryos. *Protoplasma*, 251(5), 1077-1087.
- Dunwell, J.M. (2010).** Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol J*, 8(4), 377-424.
- Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J.V. & Gómez-Cadenas, A.**

- (2005). Simultaneous Determination of Multiple Phytohormones in Plant Extracts by Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8437-8442.
- Earley, K.W., Shook, M.S., Brower-Toland, B., Hicks, L., & Pikaard, C.S.** (2007). *In vitro* specificities of Arabidopsis co-activator histone acetyltransferases: implications for histone hyperacetylation in gene activation. *Plant J*, 52(4), 615-626.
- Elhiti, M., & Stasolla, C.** (2011). Ectopic expression of the Brassica SHOOTMERISTEMLESS attenuates the deleterious effects of the auxin transport inhibitor TIBA on somatic embryo number and morphology. *Plant Sci*, 180(2), 383-390.
- El-Tantawy, A.A., Solís, M.T., Risueño, M.C., & Testillano, P.S.** (2014). Changes in DNA methylation levels and nuclear distribution patterns after microspore reprogramming to embryogenesis in barley. *Cytogenet Genome Res*, 143(1-3), 200-208.
- El-Tantawy, A.A., Solís, M.T., Costa, M.L., Coimbra, S., Risueño, M.C., & Testillano, P.S.** (2013). Arabinogalactan protein profiles and distribution patterns during microspore embryogenesis and pollen development in *Brassica napus*. *Plant Reproduction*, 26(3), 231-243.
- Engelmann, F., Benson, E. E., Chabrilange, N., González Arnao, M. T., Mari, S., Michaux-Ferriere, N., Paulet, F., Glaszmann, J.C., Charrier, A.** (1995). Cryopreservation of Several Tropical Plant Species using Encapsulation/Dehydration of Apices. In M. Terzi, R. Cella & A. Falavigna (Eds.), *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology* (Vol. 22, pp. 315-320): Springer Netherlands.
- Ermel, F.F., Follet-Gueye, M.L., Cibert, C., Vian, B., Morvan, C., Catesson, A.M., & Goldberg, R.** (2000). Differential localization of arabinan and galactan side chains of rhamnogalacturonan 1 in cambial derivatives. *Planta*, 210(5), 732-740.
- Esmon, C.A., Tinsley, A.G., Ljung, K., Sandberg, G., Hearne, L.B., & Liscum, E.** (2006). A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(1), 236-241.
- Fehér, A., Pasternak, T.P., & Dudits, D.** (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(3), 201-228.
- Fernández-Guijarro, B., Celestino, C., & Toribio, M.** (1995). Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41(2), 99-106.
- Ferrie, A.M.R. & Caswell, K.L.** (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(3), 301-309.
- Ferrie, A.M.R., Dirpaul, J., Krishna, P., Krochko, & Keller, W.A.** (2005). Effects of



- brassinosteroids on microspore embryogenesis in Brassica species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(6), 742-745.
- Forestan, C., & Varotto, S.** (2012). The Role of PIN Auxin Efflux Carriers in Polar Auxin Transport and Accumulation and Their Effect on Shaping Maize Development. *Molecular Plant*, 5(4), 787-798.
- Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J., & Touraev, A.** (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci*, 12(8), 368-375.
- Fortes, A.M., Miersch, O., Lange, P.R., Malho, R., Testillano, P.S., Risueño, M.C., Wasternack, C., Pais, M.S.** (2005) Expression of allene oxide cyclase and accumulation of jasmonates during organogenic nodule formation from hop (*Humulus lupulus* var. Nugget) internodes. *Plant and cell physiology* 46(10) 1713-1723.
- Fortes, A.M., Testillano, P.S., Risueño, M.C., & Pais, M.S.** (2002). Studies on callose and cutin during the expression of competence and determination for organogenic nodule formation from internodes of *Humulus lupulus* var. Nugget. *Physiol Plant*, 116(1), 113-120.
- Fraga, M.F.** (2009). Genetic and epigenetic regulation of aging. *Curr Opin Immunol*, 21(4), 446-453.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., Jurgens, G.** (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature*, 426(6963), 147-153.
- García-Martín, G., Manzanera, J.A., & González-Benito, M.E.** (2005). Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80(2), 171-177.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jurgens, G., & Palme, K.** (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413(6854), 425-428.
- Germanà, M.A.** (2011a). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(3), 283-300.
- Germanà, M.A.** (2011b). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep*, 30(5), 839-857.
- Germanà, M.A.** (2009). Haploids and Doubled Haploids in Fruit Trees. In A. Touraev, B. Forster & S. M. Jain (Eds.), *Advances in Haploid Production in Higher Plants* (pp. 241-263): Springer Netherlands.
- Germanà, M.A., Chiancone, B., Guarda, N.L., Testillano, P.S., & Risueño, M.C.** (2006). Development of multicellular pollen of *Eriobotrya japonica* Lindl. through anther culture. *Plant Science*, 171(6), 718-725.
- Goldberg, R., Morvan, C., & Roland, J.C.** (1986). Composition, Properties and Localisation of Pectins in Young and Mature Cells of the Mung Bean Hypocotyl. *Plant and Cell Physiology*,

27(3), 417-429.

- Goldberg, R.B., Barker, S.J., & Pérez-Grau, L.** (1989). Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell*, 56(2), 149-160.
- Goldberg, R.B., de Paiva, G., & Yadegari, R.** (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*, 266(5185), 605-614.
- Gómez, A., López, J.A., Pintos, B., Camafeita, E., & Bueno, M.A.** (2009). Proteomic analysis from haploid and diploid embryos of *Quercus suber* L. identifies qualitative and quantitative differential expression patterns. *Proteomics*, 9(18), 4355-4367.
- Gómez-Garay, A., López, J.A., Camafeita, E., Bueno, M.A., & Pintos, B.** (2013). Proteomic perspective of *Quercus suber* somatic embryogenesis. *J Proteomics*, 93, 314-325.
- González-Melendi, P., Testillano, P.S, Ahmadian, P., Fadón, B., Vicente, O., & Risueño, M.C.** (1995). In situ characterization of the late vacuolate microspore as a convenient stage to induce embryogenesis in *Capsicum*. *Protoplasma*, 187(1-4), 60-71.
- González-Sánchez, M., Heredia, V., Díez, M., & Puertas, M.J.** (2014). Rye B chromosomes influence the dynamics of histone H3 methylation during microgametogenesis. *Cytogenet Genome Res*, 143(1-3), 189-199.
- Grafi, G., Florentin, A., Ransbotyn, V., & Morgenstern, Y.** (2011). The stem cell state in plant development and in response to stress. *Front Plant Sci*, 2, 53.
- Grant-Downton, R.T., & Dickinson, H.G.** (2006). Epigenetics and its implications for plant biology 2. The 'epigenetic epiphany': epigenetics, evolution and beyond. *Ann Bot*, 97(1), 11-27.
- Gray, D.J., Purohit, A., & Trigiano, R.N.** (1991). Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(1), 33-61.
- Guglielmino, N., Liberman, M., Catesson, A.M., Mareck, A., Prat, R., Mutaftschiev, S., & Goldberg, R.** (1997). Pectin methylesterases from poplar cambium and inner bark: localization, properties and seasonal changes. *Planta*, 202(1), 70-75.
- Guha, S., & Maheshwari, S.C.** (1964). In vitro Production of Embryos from Anthers of *Datura*. *Nature*, 204(4957), 497-497.
- Guillemin, F., Guillon, F., Bonnin, E., Devaux, M.F., Chevalier, T., Knox, J.P., Liners, F., Thibault, J.F.** (2005). Distribution of pectic epitopes in cell walls of the sugar beet root. *Planta*, 222(2), 355-371.
- Hadfi, K., Speth, V., & Neuhaus, G.** (1998). Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development*, 125(5), 879-887.
- Hakman, I., Hallberg, H., & Palovaara, J.** (2009). The polar auxin transport inhibitor NPA impairs embryo morphology and increases the expression of an auxin efflux facilitator

- protein PIN during *Picea abies* somatic embryo development. *Tree Physiol*, 29(4), 483-496.
- Hamidah, M., Karim, A.G.A., & Debergh, P.** (1997). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48(3), 189-193.
- Hari, V.** (1980). Effect of Cell Density Changes and Conditioned Media on Carrot Cell Embryogenesis. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 96(3), 227-231.
- Hasegawa, Y., Nakamura, S., Uheda, E., & Nakamura, N.** (2000). Immunolocalization and possible roles of pectins during pollen growth and callose plug formation in angiosperms. *Grana*, 39(1), 46-55.
- Hezroni, H., Tzchori, I., Davidi, A., Mattout, A., Biran, A., Nissim-Rafinia, M., Westphal, H., Meshorer, E.** (2011). H3K9 histone acetylation predicts pluripotency and reprogramming capacity of ES cells. *Nucleus*, 2(4), 300-309.
- Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., de Almeida Engler, J., Inze, D., & Beeckman, T.** (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*, 14(10), 2339-2351.
- Höfer, M.** (2005). Regeneration of androgenic embryos in apple (*Malus x domestica* Brokh.) via anther and microspore culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27(4), 709-716.
- Hoffmann, R.D., & Palmgren, M.G.** (2013). Epigenetic repression of male gametophyte-specific genes in the Arabidopsis sporophyte. *Mol Plant*, 6(4), 1176-1186.
- Hosp, J., de Maraschin, S.F., Touraev, A., & Boutilier, K.** (2007). Functional genomics of microspore embryogenesis. *Euphytica*, 158(3), 275-285.
- Houben, A., Kumke, K., Nagaki, K., & Hause, G.** (2011). CENH3 distribution and differential chromatin modifications during pollen development in rye (*Secale cereale* L.). *Chromosome Res*, 19(4), 471-480.
- Hsieh, C. L.** (2000). Dynamics of DNA methylation pattern. *Curr Opin Genet Dev*, 10(2), 224-228.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A.** (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell*, 25(9), 3159-3173.
- Imamura, J., & Harada, H.** (1981). Stimulation of Tobacco Pollen Embryogenesis by Anaerobic Treatments. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 103(3), 259-263.
- Ishikawa, T., Okazaki, K., Kuroda, H., Itoh, K., Mitsui, T., & Hori, H.** (2007). Molecular cloning of *Brassica rapa* nitrilases and their expression during clubroot development. *Mol Plant Pathol*, 8(5), 623-637.
- Jain, S., Sopory, S., & Veilleux, R.** (1996). *In vitro* haploid production in higher plants. Dordrecht: Kluwer.
- Jeong, W.J., Min, S.R., & Liu, J.R.** (1995). Somatic embryogenesis and plant regeneration in

- tissue cultures of radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Cell Reports*, 14(10), 648-651.
- Jeya Mary., R., & Jayabalan, N.** (1997). Influence of growth regulators on somatic embryogenesis in sesame. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49(1), 67-70.
- Jiménez, V.M.** (2005). Involvement of Plant Hormones and Plant Growth Regulators on in vitro Somatic Embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47(2-3), 91-110.
- Johnson, L., Mollah, S., García, B.A., Muratore, T.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., & Jacobsen, S.E.** (2004). Mass spectrometry analysis of Arabidopsis histone H3 reveals distinct combinations of post-translational modifications. *Nucleic Acids Res*, 32(22), 6511-6518.
- Jurgens, G.** (1995). Axis formation in plant embryogenesis: cues and clues. *Cell*, 81(4), 467-470.
- Kasha, K.J.** (1974). Haploids in higher plants: advances and potential. *Guelph: The office of continuing education, University of Guelph Press*.
- Klimaszewska, K., Park, Y.S., Overton, C., Maceacheron, I., & Bonga, J.M.** (2001). Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(3), 392-399.
- Knox, J.P.** (1997). The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *Int Rev Cytol* 171:79-120.
- Köhler, C., Hennig, L., Spillane, C., Pien, S., Gruissem, W., & Grossniklaus, U.** (2003). The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene PHERES1. *Genes & Development*, 17(12), 1540-1553.
- Köhler, C., Wolff, P., & Spillane, C.** (2012). Epigenetic mechanisms underlying genomic imprinting in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 63, 331-352.
- Kouzarides, T.** (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., León, S., Ljung, K., Zazamalova, E., Benkova, E., Nacry, P., & Gojon, A.** (2010). Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev Cell*, 18(6), 927-937.
- Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D., & Loerz, H.** (2006). Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol J*, 4(2), 251-261.
- Kyo, M.** (1990). Effects of EDTA and Acidified Medium on the Dedifferentiation of Immature Pollen in a Tobacco Pollen Culture. *Plant and Cell Physiology*, 31(8), 1249-1251.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Larsson, E., Sitbon, F., Ljung, K., & von Arnold, S.** (2008). Inhibited polar auxin transport

- results in aberrant embryo development in Norway spruce. *New Phytol*, 177(2), 356-366.
- Latrasse, D., Benhamed, M., Henry, Y., Domenichini, S., Kim, W., Zhou, D. X., & Delarue, M.** (2008). The MYST histone acetyltransferases are essential for gametophyte development in Arabidopsis. *BMC Plant Biol*, 8, 121.
- Leal, F., Pinto-Carnide, O., Guedes-Pinto, H., Pais, M.S.** (2004) Embryogenesis and plant regeneration in *Vitis vinifera* L. by anther culture. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> international symposium on grapevine growing, commerce and research* 652-447-451.
- Lee, M.G., Wynder, C., Cooch, N., & Shiekhhattar, R.** (2005). An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature*, 437(7057), 432-435.
- Leeb, M., & Wutz, A.** (2012). Establishment of epigenetic patterns in development. *Chromosoma*, 121(3), 251-262.
- Leverone L.A., Stroup, T.L. & Caruso, J.L.** (1991) Western blot analysis of cereal grain prolamins using an antibody to carboxyl-linked indoleacetic Acid. *Plant Physiol* 96 (4): 1076-1078.
- Li, S.G., Li, W.F., Han, S.Y., Yang, W.H., & Qi, L.W.** (2013). Stage-specific regulation of four HD-ZIP III transcription factors during polar pattern formation in *Larix leptolepis* somatic embryos. *Gene*, 522(2), 177-183.
- Li, W., & Liu, M.** (2011). Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine in Different Human Tissues. *Journal of Nucleic Acids*, 2011.
- Lichter, R.** (1982). Induction of Haploid Plants From Isolated Pollen of Brassica napus. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 105(5), 427-434.
- Lippman, Z., Gendrel, A.V., Black, M., Vaughn, M.W., Dedhia, N., McCombie, W. R., Lavine, K., Mittal, V., May, B., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Doerge, R.W., Colot, V., & Martienssen, R.** (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, 430(6998), 471-476.
- Liu, C., Lu, F., Cui, X., & Cao, X.** (2010). Histone methylation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, 61, 395-420.
- Liu, C., Xu, D., Han, H., Fan, Y., Schain, F., Xu, Z., Claesson, H.E., Bjorkholm, M., & Sjöberg, J.** (2012). Transcriptional regulation of 15-lipoxygenase expression by histone h3 lysine 4 methylation/demethylation. *PLoS One*, 7(12), e52703.
- Liu, C., Xu, Z., & Chua, N. H.** (1993). Auxin Polar Transport Is Essential for the Establishment of Bilateral Symmetry during Early Plant Embryogenesis. *Plant Cell*, 5(6), 621-630
- Liu, W, Zheng, M.Y., Polle, E.A., & Konzak, C.F.** (2002). Highly Efficient Doubled-Haploid Production in Wheat (*Triticum aestivum* L.) via Induced Microspore Embryogenesis. *Crop Sci.*, 42(3), 686-692.

- Liu, X., Luo, M., Zhang, W., Zhao, J., Zhang, J., Wu, K., Tian, L., & Duan, J.** (2012). Histone acetyltransferases in rice (*Oryza sativa* L.): phylogenetic analysis, subcellular localization and expression. *BMC Plant Biol*, 12, 145.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lopes, T., Pinto, G., Loureiro, J., Costa, A., & Santos, C.** (2006). Determination of genetic stability in long-term somatic embryogenic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers. *Tree Physiol*, 26(9), 1145-1152.
- Lopez-Saez, J.F., Gimenez, G. & Risueño, M.C.** (1966) Fine structure of plasmodesm. *Protoplasma* 61 (1-2) 81-84.
- Lusser, A., Kölle, D., & Loidl, P.** (2001). Histone acetylation: lessons from the plant kingdom. *Trends in Plant Science*, 6(2), 59-65.
- Toribio, M.** (1986). Callus initiation and primary morphogenic responses from *Quercus suber* L. cotyledons cultured in vitro. *Proc. 18th. IUFRO World Congress. Div. 2, Vol II (p. 863). Ljubljana, Slovenia.*
- Maâtaoui, M.E., Espagnac, H., & Michaux-Ferrière, N.** (1990). Histology of Callogenesis and Somatic Embryogenesis Induced in Stem Fragments of Cork Oak (*Quercus suber*) Cultured In Vitro. *Annals of Botany*, 66(2), 183-190.
- Magoon, M.L., & Khanna, K.R.** (1963). Haploids. *Caryologia*, 16(1), 191-235.
- Malik, M.R., Wang, F., Dirpaul, J.M., Zhou, N., Hammerlindl, J., Keller, W., Abrams, S.R., Ferrie, A.M., & Krochko, J.E.** (2008). Isolation of an embryogenic line from non-embryogenic *Brassica napus* cv. Westar through microspore embryogenesis. *J Exp Bot*, 59(10), 2857-2873.
- Malinowski, R., & Filipecki, M.** (2002). The role of cell wall in plant embryogenesis. *Cell Mol Biol Lett*, 7(4), 1137-1151.
- Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., & Szarejko, I.** (2003). Doubled haploid production in crop plants- A Manual. *Kluwer Academic Publisher.*
- Mano, Y., & Nemoto, K.** (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany.*
- Mansfield, S.G., Briarty, L.G., & Erni, S.** (1991). Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. I. The mature embryo sac. *Canadian Journal of Botany*, 69(3), 447-460
- Manzanera, J.A., Astorga, R., & Bueno, M. A.** (1993). Somatic embryo induction and germination in *Quercus suber* L. *Silvae Genetica*, 42, 2-3.
- Maraschin, S. F., de Priester, W., Spaink, H. P., & Wang, M.** (2005). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of*

*Experimental Botany*, 56(417), 1711-1726.

- Massonneau, A., Coronado, M.J., Audran, A., Bagniewska, A., Mol, R., Testillano, P.S., Goralski, G., Dumas, C., Risueño, M.C., & Matthys-Rochon, E.** (2005). Multicellular structures developing during maize microspore culture express endosperm and embryo-specific genes and show different embryogenic potentialities. *Eur J Cell Biol*, 84(7), 663-675.
- McCown, B.H., & Sellmer, J.C.** (1987). General Media and Vessels Suitable for Woody Plant Culture. In J. M. Bonga & D. Durzan (Eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry* (Vol. 24-26, pp. 4-16): Springer Netherlands.
- McRae, D.H., & Bonner, J.** (1953). Chemical Structure and Antiauxin Activity1. *Physiologia Plantarum*, 6(3), 485-510.
- McSteen, P.** (2010). Auxin and Monocot Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3).
- Meijón, M., Valledor, L., Santamaría, E., Testillano, P.S., Risueño, M. C., Rodríguez, R., Feito, I., & Canal, M. J.** (2009). Epigenetic characterization of the vegetative and floral stages of azalea buds: dynamics of DNA methylation and histone H4 acetylation. *J Plant Physiol*, 166(15), 1624-1636.
- Merkle, S.A., Parrott, W.A., & Flinn, B.S.** (1995). Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. In T. Thorpe (Ed.), *In Vitro Embryogenesis in Plants* (Vol. 20, pp. 155-203): Springer Netherlands.
- Mirouze, M., & Paszkowski, J.** (2011). Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 14(3), 267-274.
- Mitchell, J.W., Mandava, N., Worley, J.F., Plimmer, J.R., & Smith, M.V.** (1970). Brassins[mdash]a New Family of Plant Hormones from Rape Pollen. *Nature*, 225(5237), 1065-1066.
- Moller, B., & Weijers, D.** (2009). Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(5), a001545.
- Montpellier, C., Burgeois, C.A., Kokalj-Vokac, N., Muleris, M., Niveleau, A., Reynaud, C., Gibaud, A., Malfoy, B., & Dutrillaux, B.** (1994). Detection of methylcytosine-rich heterochromatin on banded chromosomes. Application to cells with various status of DNA methylation. *Cancer Genet Cytogenet*, 78(1), 87-93.
- Moreno-Risueño, M. A., Van Norman, J. M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S. E., & Benfey, P. N.** (2010). Oscillating gene expression determines competence for periodic Arabidopsis root branching. *Science*, 329(5997), 1306-1311
- Mravec, J., Skupa, P., Bailly, A., Hoyerova, K., Krecek, P., Bielach, A., Petrášek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y.D., Dobrev, P.I., Schwarzerova, K., Rolik, J.,**

- Seifertova, D., Luschig, C., Benkova, E., Zazimalova, E., Geisler, M., & Friml, J.** (2009). Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, 459(7250), 1136-1140.
- Murashige, T., & Skoog, F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murphy, A.S., Hoogner, K.R., Peer, W.A., & Taiz, L.** (2002). Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalimic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from Arabidopsis. *Plant Physiol*, 128(3), 935-950.
- Nelissen, H., Fleury, D., Bruno, L., Robles, P., De Veylder, L., Traas, J., Micol, J.L., Van Montagu, M., Inze, D., & Van Lijsebettens, M.** (2005). The elongata mutants identify a functional Elongator complex in plants with a role in cell proliferation during organ growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(21), 7754-7759.
- Nishimura, T., Toyooka, K., Sato, M., Matsumoto, S., Lucas, M. M., Strnad, M., Baluška, F., & Koshiba, T.** (2011). Immunohistochemical observation of indole-3-acetic acid at the IAA synthetic maize coleoptile tips. *Plant Signal Behav*, 6(12), 2013-2022.
- Ogas, J., Kaufmann, S., Henderson, J., & Somerville, C.** (1999). PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13839-13844.
- Onder, T. T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A. U., Zhu, N., Bernt, K. M., Cachan, P., Marcarci, B.O., Unternaehrer, J., Gupta, P.B., Lander, E.S., Armstrong, S.A., & Daley, G. Q.** (2012). Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature*, 483(7391), 598-602.
- Oono, Y., Ooura, C., Rahman, A., Aspúria, E.T., Hayashi, K., Tanaka, A., & Uchimiya, H.** (2003). p-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in Arabidopsis root. *Plant Physiol*, 133(3), 1135-1147.
- Orshinsky, B.R., McGregor, L.J., Johnson, G.I., Hucl, P., & Kartha, K.K.** (1990). Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. *Plant Cell Rep*, 9(7), 365-369.
- Palmer, C.E., Keller, Wilfred A., & Kasha, K. J.** (2005). Haploids in crop improvement II. *Springer, Heidelberg*.
- Pandey, R., Muller, A., Napoli, C.A., Selinger, D.A., Pikaard, C S., Richards, E.J., Bender, J., Mount, D.W., & Jorgensen, R. A.** (2002). Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of Arabidopsis thaliana suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 30(23), 5036-5055.



- Park, S.Y., Ahn, J.K., Lee, W.Y., Murthy, H.N., P., & Paek, K.Y.** (2005). Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. *Plant Science*, 168(5), 1221-1225.
- Pauls, K.P., Chan, J., Woronuk, G., Schulze, D., & Brazolot, J.** (2006). When microspores decide to become embryos — cellular and molecular changes This review is one of a selection of papers published in the Special Issue on Plant Cell Biology. *Canadian Journal of Botany*, 84(4), 668-678.
- Pechan, P.M., & Keller, W.A.** (1988). Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 74(2), 377-384.
- Pedroso, M.C., & Pais, M.S.** (1995). Factors controlling somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43(2), 147-154.
- Peer, W.A.** (2013). From perception to attenuation: auxin signalling and responses. *Curr Opin Plant Biol*, 16(5), 561-568.
- Peixe, A., Barroso, J., Potes, A., Pais, M.S.** (2004) Induction of haploid morphogenic calluses from *in vitro* cultured anthers of *Prunus armeniaca* cv Harcot. *Plant cell tissue and organ culture* 77(1) 35-41.
- Pelletier, S., Van Orden, J., Wolf, S., Vissenberg, K., Delacourt, J., Ndong, Y. A., Pelloux, J., Bischoff, V., Urbain, A., Mouille, G., Lemonnier, G., Renou, J.P. & Hofte, H.** (2010). A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *New Phytol*, 188(3), 726-739.
- Pelloux, J., Rusterucci, C., & Mellerowicz, E.J.** (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci*, 12(6), 267-277.
- Perrot-Rechenmann, C.** (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5), a001446
- Petrášek, J., & Friml, J.** (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136(16), 2675-2688.
- Pinto, G., Park, Y.S., Silva, S., Neves, L., Araújo, C., & Santos, C.** (2008). Factors affecting maintenance, proliferation, and germination of secondary somatic embryos of *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95(1), 69-78.
- Pintos, B., Manzanera, J.A., & Bueno, M.A.** (2005). Cytological analysis of early microspore divisions leading to gametic embryo formation in *Quercus suber* L. anther cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27(4), 703-708.
- Poveda, A., Pamblanco, M., Tafrov, S., Tordera, V., Sternglanz, R., & Sendra, R.** (2004). Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus. *J Biol Chem*, 279(16), 16033-16043.

- Prasad, P., & Dhonukshe, K.** (2013). *Polar Auxin Transport: Cell Polarity to Patterning* (B. F. Chen R. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013 ed. Vol. 17).
- Prem, D., Gupta, K., & Agnihotri, A.** (2005). Effect of various exogenous and endogenous factors on microspore embryogenesis in Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern and Coss). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(3), 266-273.
- Prem, D., Gupta, K., Sarkar, G., & Agnihotri, A.** (2008). Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(3), 269-282
- Prem, D., Solís, M.T., Bárány, I., Rodríguez-Sanz, H., Risueño, M.C., & Testillano, P.S.** (2012). A new microspore embryogenesis system under low temperature which mimics zygotic embryogenesis initials, expresses auxin and efficiently regenerates doubled-haploid plants in *Brassica napus*. *BMC Plant Biol*, 12, 127.
- Pritchard, H.N.** (1964). A Cytochemical Study of Embryo Development in *Stellaria Media*. *American Journal of Botany*, 51(5), 472-479.
- Rademacher, E.H., Lokerse, A.S., Schlereth, A., Llavata-Peris, C.I., Bayer, M., Kientz, M., Freire Rios, A., Borst, J.W., Lokowitz, W., Jurgens, G., & Weijers, D.** (2012). Different auxin response machineries control distinct cell fates in the early plant embryo. *Dev Cell*, 22(1), 211-222.
- Rademacher, E.H., Moller, B., Lokerse, A.S., Llavata-Peris, C.I., van den Berg, W., & Weijers, D.** (2011). A cellular expression map of the Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR gene family. *Plant J*, 68(4), 597-606
- Raghavan, V.** (1986). Pollen embryogenesis. In *Embryogenesis in Angiosperms, a developmental and experimental study*, London: Cambridge University Press.
- Raghavan, V.** (2004). Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of Arabidopsis: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *Am J Bot*, 91(11), 1743-1756.
- Ramírez, C., Chiancone, B., García-Fojeda, B., Germanà, M.A., Risueño, M.C., & Testillano, P.S.** (2003). First embryogenic stages of Citrus microspore-derived embryos. *Acta Biologica Cracoviensa, Series Botanica* 45/1:53-58.
- Ramírez, C., Testillano, P.S., Pintos, B., Moreno-Risueño, M.A., Bueno, M.A., & Risueño, M.C.** (2004). Changes in pectins and MAPKs related to cell development during early microspore embryogenesis in *Quercus suber* L. *Eur J Cell Biol*, 83(5), 213-225.
- Rentrop, M., Knapp, B., Winter, H., & Schweizer, J.** (1986). Differential localization of distinct keratin mRNA-species in mouse tongue epithelium by in situ hybridization with specific

cDNA probes. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2), 2583-2591.

- Robert, H. S., Grones, P., Stepanova, A. N., Robles, L. M., Lokerse, A. S., Alonso, J. M., Weijers, D., & Friml, J.** (2013). Local auxin sources orient the apical-Basal axis in Arabidopsis embryos. *Curr Biol*, 23(24), 2506-2512.
- Rodríguez-Sanz, H., Moreno-Romero, J., Solís, M.T., Köhler, C., Risueño, M.C., & Testillano, P.S.** (2014). Changes in histone methylation and acetylation during microspore reprogramming to embryogenesis occur concomitantly with BnHKMT and BnHAT expression and are associated to cell totipotency, proliferation and differentiation in *Brassica napus*. *Cytogenetic and Genome Research*. 143(1-3): 209-218.
- Rodríguez-Serrano, M., Bárány, I., Prem, D., Coronado, M.J., Risueño, M.C., & Testillano, P.S.** (2012). NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *Journal of Experimental Botany*. 63, 2007-2024.
- Rybaczek, D., & Maszewski, J.** (2007). Phosphorylation of H2AX histones in response to double-strand breaks and induction of premature chromatin condensation in hydroxyurea-treated root meristem cells of *Raphanus sativus*, *Vicia faba*, and *Allium porrum*. *Protoplasma*, 230(1-2), 31-39.
- Ryden, P., Sugimoto-Shirasu, K., Smith, A.C., Findlay, K., Reiter, W.D., & McCann, M.C.** (2003). Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiol*, 132(2), 1033-1040.
- Sasco A.J., Rey, F., Reynaud, C., Bobin, J.Y., Clavel, M., & Niveleau, A.** (1986) Breast cancer prognostic significance of some modified urinary nucleosides. *Cancer Left* 108(2):157-162.
- Satpute, G.K., Long, H., Seguí-Simarro, J.M., Risueño, M.C., & Testillano, P.S.** (2005). Cell architecture during gametophytic and embryogenic microspore development in *Brassica napus* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27(4), 665-674.
- Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T., & Nishimura, T.** (2012). DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant Cell Physiol*, 53(5), 766-784.
- Schlicht, M., Strnad, M., Scanlon, M. J., Mancuso, S., Hochholdinger, F., Palme, K., Volkmann, D., Menzel, D., & Baluška, F.** (2006). Auxin immunolocalization implicates vesicular neurotransmitter-like mode of polar auxin transport in root apices. *Plant Signal Behav*, 1(3), 122-133.
- Schulz, R., & Jensen, W.A.** (1968). Capsella Embryogenesis: The Egg, Zygote, and Young Embryo. *American Journal of Botany*, 55(7), 807-819.

- Scott, R., Hodge, R., Paul, W., & Draper, J.** (1991). The molecular biology of anther differentiation. *Plant Science*, 80(1–2), 167-191.
- Sebastiana, M., Vieira, B., Lino-Nieto, T., Monteiro, F., Figueredo, A., Sousa, L., Pais, M.S., Tavares, R., Paulo, O.S.** (2014) Oak root response to ectomycorrhizal symbiosis establishment: RNA-Seq derived transcript identification and expression profiling. *Plos ONE* 9(5)
- Seguí-Simarro, J. M., Bárány, I., Suarez, R., Fadón, B., Testillano, P. S., & Risueño, M. C.** (2006). Nuclear bodies domain changes with microspore reprogramming to embryogenesis. *Eur J Histochem*, 50(1), 35-44.
- Seguí-Simarro, J.M., Corral-Martinez, P., Corredor, E., Raska, I., Testillano, P.S., & Risueño, M.C.** (2011). A change of developmental program induces the remodeling of the interchromatin domain during microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. *J Plant Physiol*, 168(8), 746-757.
- Seguí-Simarro, J.M., Testillano, P.S., Jouannic, S., Henry, Y., & Risueño, M.C.** (2005). Mitogen-activated protein kinases are developmentally regulated during stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. *Histochem Cell Biol*, 123(4-5), 541-551.
- Seguí-Simarro, J.M., Testillano, P.S., & Risueño, M.C.** (2003). Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus* L. *J Struct Biol*, 142(3), 379-391.
- Servet, C., Conde e Silva, N., & Zhou, D.X.** (2010). Histone acetyltransferase AtGCN5/HAG1 is a versatile regulator of developmental and inducible gene expression in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 3(4), 670-677.
- Shi, Y., & Whetstine, J.R.** (2007). Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell*, 25(1), 1-14.
- Shibukawa, T., Yazawa, K., Kikuchi, A., & Kamada, H.** (2009). Possible involvement of DNA methylation on expression regulation of carrot LEC1 gene in its 5'-upstream region. *Gene*, 437(1-2), 22-31.
- Shivanna, K.R., & Johri, B.M.** (1985). The angiosperm pollen. *New Delhi: Mohinder Singh Sejwal*.
- Smertenko, A., & Bozhkov, P.V.** (2014). Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. *J Exp Bot*, 65(5), 1343-1360.
- Smith, Bronwen G., & Harris, Philip J.** (1999). The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(1), 33-53.
- Smýkal, P.** (2000). Pollen Embryogenesis - The Stress Mediated Switch from Gametophytic to Sporophytic Development. Current Status and Future Prospects. *Biologia Plantarum*, 43(4), 481-489.

- Solís, M.T.** (2012) *Reprogramacion del polen a embriogenesis inducida por estrés: identidad celular, muerte celular programada y papel de la metilación del DNA*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Solís, M. T., Chakrabarti, N., Corredor, E., Cortes-Eslava, J., Rodríguez-Serrano, M., Biggiogera, M., Risueño, M.C., & Testillano, P. S.** (2014). Epigenetic changes accompany developmental programmed cell death in tapetum cells. *Plant Cell Physiol*, 55(1), 16-29.
- Solís, M.T., Rodríguez-Serrano, M., Meijón, M., Canal, M.J., Cifuentes, A., Risueño, M.C., & Testillano, P.S.** (2012). DNA methylation dynamics and MET1a-like gene expression changes during stress-induced pollen reprogramming to embryogenesis. *J Exp Bot*, 63(18), 6431-6444.
- Solís, M.T., Testillano P.S., Pintos, B., Prado, M.J., Bueno, M.A., & Risueño, M.C.** (2006). Defined cellular changes as markers of microspore reprogramming to embryogenesis in *Olea europaea* L. *Biotechnology and Quality of Olive Tree Products around the Mediterranean Basin*, Caruso T. (ed) (Univ. Palermo Publishing, Marsala, Italia), 231-235.
- Solís, M.T., Pintos, B., Prado, M.J., Bueno, M.Á., Raska, I., Risueño, M.C., & Testillano, P.S.** (2008). Early markers of in vitro microspore reprogramming to embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Science*, 174(6), 597-605.
- Sommer, H.E., Brown, C.L., & Kormanik, P.P.** (1975). Differentiation of Plantlets in Longleaf Pine (*Pinus palustris* Mill.) Tissue Cultured In vitro. *Botanical Gazette*, 136(2), 196-200.
- Srivastava, P., & Chaturvedi, R.** (2008). In vitro androgenesis in tree species: an update and prospect for further research. *Biotechnol Adv*, 26(5), 482-491.
- Stancheva, I.** (2005). Caught in conspiracy: cooperation between DNA methylation and histone H3K9 methylation in the establishment and maintenance of heterochromatin. *Biochem Cell Biol*, 83(3), 385-395.
- Sterner, D.E., & Berger, S.L.** (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(2), 435-459.
- Steward, F.C., Marion, O.M., & Mears, K.** (1958). Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *American Journal of Botany*, 45(10), 705-708
- Teale, W.D., Paponov, I.A., & Palme, K.** (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(11), 847-859.
- Testillano, P.S., Coronado, M., Thierry, A., Matthys-Rochon, E., & Risueño, M.C.** (2010). In situ detection of ESR proteins secretion during maize microspore embryogenesis and their secretion blockage show effects on the culture progression. *Functional Plant Biology*, 37(10),

985-994.

- Testillano, P.S., Coronado, M.J., Seguí, J.M., Domenech, J., González-Melendi, P., Raska, I., & Risueño, M.C.** (2000). Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis. *J Struct Biol*, 129(2-3), 223-232.
- Testillano, P.S., Ramírez, C., Domenech, J., Coronado, M.J., Vergne, P., Matthys-Rochon, E., & Risueño, M.C.** (2002). Young microspore-derived maize embryos show two domains with defined features also present in zygotic embryogenesis. *Int J Dev Biol*, 46(8), 1035-1047.
- Testillano, P.S., & Risueño, M.C.** (2008). Tracking Gene and Protein Expression During Microspore Embryogenesis by Confocal Laser Scanning Microscopy. In A. Touraev, B. Forster & S. M. Jain (Eds.), *Advances in Haploid Production in Higher Plants* (pp. 339-347): Springer Netherlands.
- Testillano, P.S., Solís, M.T., & Risueño, M.C.** (2013). The 5-methyl-deoxy-cytidine (5mdC) localization to reveal in situ the dynamics of DNA methylation chromatin pattern in a variety of plant organ and tissue cells during development. *Physiol Plant*, 149(1), 104-113.
- Testillano P.S., González-Melendi P, Coronado M.J., Seguí J.M., Moreno M.A., & Risueño M.C.** (2005). Differentiating plant cells switched to proliferation remodel the functional organization of nuclear domains. *Cytogenet. Genome Res.*, 109, 166-174.
- Thorstensen, T., Fischer, A., Sandvik, S.V., Johnsen, S.S., Grini, P.E., Reuter, G., & Aalen, R.B.** (2006). The Arabidopsis SUVH4 protein is a nucleolar histone methyltransferase with preference for monomethylated H3K9. *Nucleic Acids Res*, 34(19), 5461-5470.
- Touraev, A., Forster, B.P., & Jain, S.** (2009). *Advances in haploid production in higher plants.* Berlin: Springer.
- Touraev, A., Ilham, A., Vicente, O., & Heberle-Bors, E.** (1996). Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep*, 15(8), 561-565.
- Touraev, A., Pfosser, M., & Heberle-Bors, E.** (2001). The microspore: A haploid multipurpose cell *Advances in Botanical Research* (Vol. Volume 35, pp. 53-109): Academic Press.
- Touraev, A., Vicente, O., & Heberle-Bors, E.** (1997). Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science*, 2(8), 297-302.
- Trinidade, H., & Pais, M.S.** (2003) Meristematic nodule culture: a new pathway for in vitro propagation of *Eucaliptus globulus*. *Trees-structure and function* 17 (4) 308-315.
- Uddenberg, D., Valladares, S., Abrahamsson, M., Sundstrom, J.F., Sundas-Larsson, A., & von Arnold, S.** (2011). Embryogenic potential and expression of embryogenesis-related genes in conifers are affected by treatment with a histone deacetylase inhibitor. *Planta*. 234

(3): 527-539.

- Vaillant, C., Palmeira, L., Chevereau, G., Audit, B., d'Aubenton-Carafa, Y., Thermes, C., & Arneodo, A. (2010). A novel strategy of transcription regulation by intragenic nucleosome ordering. *Genome Res*, 20(1), 59-67
- Valladares, S., Toribio, M., Celestino, C., & Vieitez, A.M. (2004). Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. *Cryo Letters*, 25(3), 177-186.
- Valledor, L., Hasbún, R., Meijón, M., Rodríguez, J.L., Santamaría, E., Viejo, M., Berdasco, M., Feito, I., Fraga, M.F., Cañal, M.J., & Rodríguez, R. (2007). Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(2), 75-86.
- van Hengel, A.J., Tadesse, Z., Immerzeel, P., Schols, H., van Kammen, A., & de Vries, S.C. (2001). N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol*, 125(4), 1880-1890.
- Vaquero, A., Scher, M.B., Lee, D.H., Sutton, A., Cheng, H.L., Alt, F. W., Serrano, L., Sternglanz, R., & Reinberg, D. (2006). SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev*, 20(10), 1256-1261.
- Vieitez, A.M., Corredoira, E., Ballester, A., Muñoz, F., Durán, J., & Ibarra, M. (2009). In vitro regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 98(2), 135-145.
- Vieitez, A.M., San-José, M.C., & Corredoira, E. (2011). Cryopreservation of zygotic embryonic axes and somatic embryos of European chestnut. *Methods Mol Biol*, 710, 201-213.
- Viejo, M., Rodríguez, R., Valledor, L., Pérez, M., Canal, M.J., & Hasbun, R. (2010). DNA methylation during sexual embryogenesis and implications on the induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa* Miller. *Sex Plant Reprod*, 23(4), 315-323
- von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233-249.
- Wabnik, K., Kleine-Vehn, J., Govaerts, W., & Friml, J. (2011). Prototype cell-to-cell auxin transport mechanism by intracellular auxin compartmentalization. *Trends Plant Sci*, 16(9), 468-475
- Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H. Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., & Zhang, Y. (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell*, 22(3), 383-394.
- West, M., & Harada, J.J. (1993). Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *Plant Cell*, 5(10),

1361-1369.

- Willats, W.G., & Knox, J.P.** (1999). Immunoprofiling of pectic polysaccharides. *Anal Biochem*, 268(1), 143-146.
- Willats, W.G.T., Knox, J.P., & Mikkelsen, J.D.** (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97-104.
- Willats, W.G.T., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J.P.** (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47(1-2), 9-27.
- Williams, E.G., & Maheswaran, G.** (1986). Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. *Annals of Botany*, 57(4), 443-462.
- Xiao, W., Custard, K.D., Brown, R.C., Lemmon, B.E., Harada, J.J., Goldberg, R.B., & Fischer, R.L.** (2006). DNA methylation is critical for Arabidopsis embryogenesis and seed viability. *Plant Cell*, 18(4), 805-814.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., & Chua, N.H.** (2000). Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev*, 14(23), 3024-3036.
- Xu, C.R., Liu, C., Wang, Y.L., Li, L.C., Chen, W.Q., Xu, Z.H., & Bai, S.N.** (2005). Histone acetylation affects expression of cellular patterning genes in the Arabidopsis root epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(40), 14469-14474.
- Xu, L., Najeeb, U., Tang, G, Gu, H, Zhang, G, HE, Y, & Zhou, W.** (2007). Haploid and doubled haploid technology. *Advances in Botanical Research: Incorporating Advances in Plant Pathology*, 45, 181-216.
- Yaish, M.W., Colasanti, J., & Rothstein, S.J.** (2011). The role of epigenetic processes in controlling flowering time in plants exposed to stress. *J Exp Bot*, 62(11), 3727-3735.
- Yuan, W., Wu, T., Fu, H., Dai, C., Wu, H., Liu, N., & Zhu, B.** (2012). Dense Chromatin Activates Polycomb Repressive Complex 2 to Regulate H3 Lysine 27 Methylation. *Science*, 337(6097), 971-975.
- Zarsky, V., Garrido, D., Eller, N., Tupy, J., Vicente, O., Schofl, F., & Heberle-Bors, E.** (1995). The expression of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation. *Plant, Cell & Environment*, 18(2), 139-147.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S. W., Chen, H., Henderson, I.R., Shin, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., & Ecker, J. R.** (2006). Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis. *Cell*, 126(6), 1189-1201.
- Zhang, Y., Lepinasse, Y., & Chevreau, E.** (1990). Induction of haploidy in fruit trees. *Acta*



*Horticulturae*, 280, 293-304.

- Zheng, M., Liu, W., Weng, Y., Polle, E., & Konzak, C.** (2001). Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals. *Plant Cell Reports*, 20(8), 685-690.
- Zhou, J., Wang, X., He, K., Charron, J. B., Elling, A. A., & Deng, X. W.** (2010). Genome-wide profiling of histone H3 lysine 9 acetylation and dimethylation in Arabidopsis reveals correlation between multiple histone marks and gene expression. *Plant Mol Biol*, 72(6), 585-595.

**ANEXO**



# Changes in Histone Methylation and Acetylation during Microspore Reprogramming to Embryogenesis Occur Concomitantly with BnHKMT and BnHAT Expression and Are Associated with Cell Totipotency, Proliferation, and Differentiation in *Brassica napus*

Héctor Rodríguez-Sanz<sup>a</sup> Jordi Moreno-Romero<sup>b</sup> María-Teresa Solís<sup>a</sup> Claudia Köhler<sup>b</sup>  
María C. Risueño<sup>a</sup> Pilar S. Testillano<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Pollen Biotechnology of Crop Plants Group, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) CSIC, Madrid, Spain;

<sup>b</sup>Department of Plant Biology, Uppsala BioCenter, Swedish University of Agricultural Sciences and Linnean Centre of Plant Biology, Uppsala, Sweden

## Key Words

Chromatin · Epigenetics · H3Ac · H4Ac · H3K9me2 · Histone acetyltransferases · Histone methyltransferases · Pollen embryogenesis

## Abstract

In response to stress treatments, microspores can be reprogrammed to become totipotent cells that follow an embryogenic pathway producing haploid and double-haploid embryos which are important biotechnological tools in plant breeding. Recent studies have revealed the involvement of DNA methylation in regulating this process, but no information is available on the role of histone modifications in microspore embryogenesis. Histone modifications are major epigenetic marks controlling gene expression during plant development and in response to environmental changes. Lysine methylation of histones, accomplished by histone lysine methyltransferases (HKMTs), can occur on different lysine residues, with histone H3K9 methylation being mainly

associated with transcriptionally silenced regions. In contrast, histone H3 and H4 acetylation is carried out by histone acetyltransferases (HATs) and is associated with actively transcribed genes. In this work, we analyzed 3 different histone epigenetic marks: dimethylation of H3K9 (H3K9me2) and acetylation of H3 and H4 (H3Ac and H4Ac) during microspore embryogenesis in *Brassica napus* by Western blot and immunofluorescence assays. The expression patterns of histone methyltransferase BnHKMT and histone acetyltransferase BnHAT genes have also been analyzed by qPCR. Our results revealed different spatial and temporal distribution patterns for methylated and acetylated histone variants during microspore embryogenesis and their similarity with the expression profiles of BnHKMT and BnHAT, respectively. The data presented suggest the participation of H3K9me2 and HKMT in embryo cell differentiation and heterochromatinization events, whereas H3Ac, H4Ac, and HAT would be involved in transcriptional activation, totipotency, and proliferation events during cell reprogramming and embryo development.

© 2014 S. Karger AG, Basel

KARGER

© 2014 S. Karger AG, Basel  
1424-8581/14/0000-0000\$39.50/0

E-Mail karger@karger.com  
www.karger.com/cgr

Pilar S. Testillano  
Pollen Biotechnology of Crop Plants Group  
Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) CSIC  
Ramiro de Maeztu 9, ES-28040 Madrid (Spain)  
E-Mail testillano@cib.csic.es

**Auxin biosynthesis, action and transport are involved in stress-induced microspore embryogenesis initiation and progression in *Brassica napus***

Journal:	<i>Plant and Cell Physiology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Regular Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rodríguez-Sanz, Héctor; Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Environmental Biology Solís, María-Teresa; Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Environmental Biology López, María-Fernanda; University Jaume I, Dep. Ciencias Agrarias y del Medio Natural Gómez-Cadenas, Aurelio; University Jaume I, Dep. Ciencias Agrarias y del Medio Natural Risueño, Mari Carmen; Centro de Investigaciones Biológicas, Centro de Investigaciones Biológicas Testillano, Pilar; Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Environmental Biology
Keywords:	Embryo development, heat stress, indol acetic acid, nitrilases, NPA, PCIB

**Title:**

Auxin biosynthesis, action and transport are involved in stress-induced microspore embryogenesis initiation and progression in *Brassica napus*

**Short title:**

Auxin dynamics in microspore embryogenesis

**Corresponding author:**

Dr. P.S. Testillano

Pollen Biotechnology of Crop Plants group

Biological Research Center, CIB-CSIC

Ramiro de Maeztu 9

28040 Madrid, Spain

Phone: +34 918373112 (Ext: 4366), Fax: +34 915360432

E-mail: testillano@cib.csic.es

**Subject areas:**

- Growth and Development
- Structure and function of cells

**Number of black/white figures:** 3

**Number of colour figures:** 7

**Title:** Auxin biosynthesis, action and transport are involved in stress-induced microspore embryogenesis initiation and progression in *Brassica napus*

**Short title:**

Auxin dynamics in microspore embryogenesis

Héctor Rodríguez-Sanz<sup>1</sup>, María-Teresa Solís<sup>1</sup>, María-Fernanda López<sup>2</sup>, Aurelio Gómez-Cadenas<sup>2</sup>, María C. Risueño<sup>1</sup>, Pilar S. Testillano<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Pollen Biotechnology of Crop Plants group. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) CSIC. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Dep. Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Universidad Jaume I, Campus Riu Sec, 12071, Castellón, Spain.

\*Corresponding author

**Abbreviations:**

APTES, aminopropyl-triethoxy-silane; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; DIC, differential interference contrast; IAA, indol-acetic acid; IAN, indol-3-acetonitrile; IF, immunofluorescence; LC/ESI-MSMS, liquid chromatography linked to mass spectrometry through an electrospray interface; NIT, nitrilase; NPA, N-1-naphthylphthalamic acid; PCIB,  $\alpha$ -(p-Chlorophenoxy) isobutyric acid; PGRs, plant growth regulators.

## ABSTRACT

Stress-induced microspore embryogenesis constitutes a convenient system for studying cell reprogramming and embryogenesis initiation mechanisms. Isolated microspores can be reprogrammed *in vitro* towards embryogenesis by stress treatments becoming totipotent cells and producing embryos which regenerate haploid and double-haploid plants. In this study, microspore embryogenesis is induced in *Brassica napus* by heat treatment in a culture medium free of plant growth regulators. No evidence on the role and dynamics of endogenous indol-acetic acid (IAA) on microspore embryogenesis is available, despite the abundant data on the auxin involvement in plant development. In this work, endogenous IAA levels and distribution patterns, expression of BnNIT2 encoding a nitrilase involved in the secondary auxin biosynthetic pathway of the indol-3-acetonitrile (IAN), and effects of inhibition of IAA transport and action by N-1-naphthylphthalamic acid (NPA) and  $\alpha$ -(p-Chlorophenoxy) isobutyric acid (PCIB) treatments were analyzed for the first time during *B. napus* microspore embryogenesis.

Results indicated *de novo* synthesis of IAA after stress-induced reprogramming of the microspore and embryogenesis initiation, accompanying the first embryogenic divisions, and a progressive increase of IAA concentration with embryo development which correlated with BnNIT2 expression. Auxin distribution was even in early embryos, whereas in heart-torpedo embryos IAA was unevenly distributed and accumulated in apical and basal regions. Inhibitions of both polar auxin transport and action by NPA and PCIB impaired embryo development, indicating that IAA transport and action are required for microspore-derived embryo formation. NPA also modified the IAA distribution pattern in embryos and lead to auxin accumulation in small cytoplasmic compartments. These findings indicate that endogenous auxin biosynthesis, action and transport are involved in microspore embryogenesis initiation and development.

**Key words:** Embryo development, indol-acetic acid, nitrilases, NPA, PCIB, rapeseed.



RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak, *Quercus suber* L

Héctor Rodríguez-Sanz<sup>1</sup>, José-Antonio Manzanera<sup>2</sup>, María-Teresa Solís<sup>1</sup>, Aránzazu Gómez-Garay<sup>3</sup>, Beatriz Pintos<sup>3</sup>, María C Risueño<sup>1</sup> and Pilar S Testillano<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** In *Quercus suber*, cork oak, a Mediterranean forest tree of economic and social interest, rapid production of isogenic lines and clonal propagation of elite genotypes have been achieved by developing *in vitro* embryogenesis from microspores and zygotic embryos respectively. Despite its high potential in tree breeding strategies, due to their recalcitrancy, the efficiency of embryogenesis *in vitro* systems in many woody species is still very low since factors responsible for embryogenesis initiation and embryo development are still largely unknown. The search for molecular and cellular markers during early stages of *in vitro* embryogenesis constitutes an important goal to distinguish, after induction, responsive from non-responsive cells, and to elucidate the mechanisms involved in embryogenesis initiation for their efficient manipulation. In this work, we have performed a comparative analysis of two embryogenesis pathways derived from microspores and immature zygotic embryos in cork oak in order to characterize early markers of reprogrammed cells in both pathways. Rearrangements of the cell structural organization, changes in epigenetic marks, cell wall polymers modifications and endogenous auxin changes were analyzed at early embryogenesis stages of the two *in vitro* systems by a multidisciplinary approach.

**Results:** Results showed that early embryo cells exhibited defined changes of cell components which were similar in both embryogenesis *in vitro* systems, cellular features that were not found in non-embryogenic cells. DNA methylation level and nuclear pattern, proportion of esterified pectins in cell walls, and endogenous auxin levels were different in embryo cells in comparison with microspores and immature zygotic embryo cells from which embryos originated, constituting early embryogenesis markers.

**Conclusions:** These findings suggest that DNA hypomethylation, cell wall remodeling by pectin esterification and auxin increase are involved in early *in vitro* embryogenesis in woody species, providing new evidences of the developmental pattern similarity between both embryogenesis pathways, from microspores and immature zygotic embryos, in woody species.

**Keywords:** Somatic embryogenesis, Microspore embryogenesis, Anther culture, DNA methylation, 5-methyl-deoxy-cytidine, Pectin esterification, Cell wall, Auxin, IAA

\* Correspondence: testillano@cib.csic.es

<sup>1</sup>Pollen Biotechnology of Crop Plants group, Biological Research Center, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Rodríguez-Sanz et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.